Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

Physiologische Veränderungen synchroner Chlorella nach Hitzebehandlung unter besonderer Berücksichtigung der hitzeempfindlichsten Phase

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Rudolf Tischner
aus Saalfeld/Saale

Göttingen 1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534922_0019

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
der Universität Göttingen

Physiologische Veränderungen synchroner Chlorella nach Hitzebehandlung unter besonderer Berücksichtigung der hitzeempfindlichsten Phase

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Rudolf Tischner

aus Saalfeld/Saale

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H. Lorenzen

Korreferent: Prof. Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: ..3..Juli.1974.....

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
EINLEITUNG		1
MATERIAL UND METHODEN		3
ERGEBNISSE		12
I.	Einwirkung von hohen Temperaturen über längere Zeit in Abhängigkeit vom Zellalter	12
II.	Charakterisierung des Wachstums nach einem längeren Schock während des Licht-Dunkel-Wechsels (≧ 20 min)	32
III.	Auswirkungen kürzerer Hitzeschocks (< 20 min)	36
IV.	Tests der Photosysteme in vitro aus verschieden lang geschockten Algen	48
V.	Einfluß von Farblicht auf die Schockwirkung	56
VI.	Untersuchung des Gesamtlipidgehaltes	59
VII.	Einfluß der Hitzeschocks auf den Phosphatstoffwechsel	59
VIII.	Untersuchung des ATP-Gehaltes	64
IX.	Untersuchung des ADP-Gehaltes	71
DISKUSSION		75
ZUSAMMENFASSUNG		86
LITERATURVERZEICHNIS		88

Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Chloro	Chlorophyll
D	Dunkel
DCMU	(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff
DCPIP	Dichlorophenolindophenol
DL	Dauerlicht
DNA	Desorxiribonucleinsäure
Dz	Dunkelzeit
E	Extinktion
FCCP	p-trifluoro-methoxy-carbonyl-cyanid-phenyl-hydrazon
g	Erdbeschleunigung
K	Kultur
Khyd	Kohlenhydrat
LDW	Licht-Dunkel-Wechsel
Lz	Lichtzeit
M	molar
mg	Milligramm
µg	Gamma
N	normal
nm	Nanometer
NK	Normalkultur
OD	Optische Dichte
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PS	Photosystem
Prot	Protein
SK	Schockkultur
Susp	Suspension
Sch	Schock
TCA	Trichloressigsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
ZZ	Zellzahl (stets relative)

E I N L E I T U N G

Grüne Einzeller werden seit längerer Zeit mit großem Erfolg für biochemische und physiologische Untersuchungen verwendet. Durch die von LORENZEN (1957) gefundene Möglichkeit, Chlorella pyrenoidosa, die wohl zu den am besten untersuchten einzelligen Grünalgen gehört, zu synchronisieren, stieg die Bedeutung dieser Organismen weiter an. War es doch nun möglich, die Untersuchungen an einheitlichem und reproduzierbarem Material durchzuführen. Dabei konnten die Befunde oftmals dem Zellalter der Algen zugeordnet werden (SENGER 1965, PIRSON und RUPPEL 1962, LORENZEN 1959).

Auf die Variation der Anzuchtbedingungen, vor allem der Temperatur richteten PIRSON, LORENZEN und KÖPPER (1959) und LORENZEN (1963) ihr Augenmerk, wobei diese Verfasser vor allem den Einfluß höherer Temperaturen untersuchten. Legte LORENZEN (1963) besonderes Gewicht auf den schädigenden Einfluß von

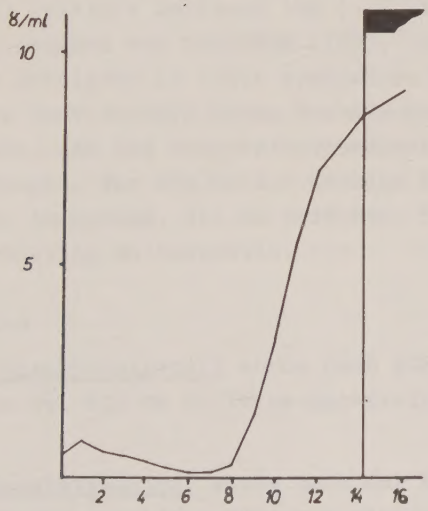

Abb. 1: Chlorophyllgehalt von Algen, die zu verschiedenen Zeiten des Zyklus einem Hitzeschock (20 min 45° C D) ausgesetzt waren, am Ende des LDW.

Dauerlicht bei Behandlung mit hoher Temperatur, so verfolgten TISCHNER und LORENZEN (1974) die Beeinflussung von Enzymaktivitäten bei Anzucht in supraoptimalen Temperaturen.

Gibt es so für den Dauereinfluß erhöhter Temperatur für dieses Objekt viele Arbeiten, so fehlen doch Untersuchungen über die Wirkung von Temperaturwechseln und kurzzeitigen Hitzebeeinflussungen. LORENZEN (1963) und JASTER (1970) befaßten sich mit dieser Fragestellung. Dabei fand letzterer eine Abhängigkeit der Empfindlichkeit gegen kurzzeitiges Erhitzen vom Zellalter der Algen. Dieser Befund konnte bestätigt werden (siehe Abb. 1).

Die vorliegende Arbeit will einen Beitrag zur Charakterisierung der empfindlichen Phase zwischen der 5. - 7. Std des Zyklus leisten. Dabei soll versucht werden, den Bereich der physiologischen Veränderungen abzustecken und eine Reihenfolge der Schädigung nachzuweisen.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Material

Alle Versuche wurden mit Chlorella pyrenoidosa Stamm 211-8b der Algensammlung des pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen durchgeführt.

Die Algen wurden in einem Lichtthermostaten der Fa. KNIESE, Marburg (Beschreibung bei LORENZEN 1959) bei 32° C und ca. 18 000 Lux (Philips Warmton de Luxe, TL 40 W - 1/32 und 2 Philips Tageslicht TL 40 W - 1/55) kultiviert.

Das Anzuchtmedium war eine mineralische Nährlösung, der Spurenelemente nach KUHL (1962) zugesetzt wurden. Das Eisen wurde als EDTA-Komplex der Nährlösung unmittelbar vor ihrer Verwendung zugesetzt (RUPPEL 1962). Die Kulturen wurden, wenn nicht besonders erwähnt, mit einem Luft-CO_2-Gemisch begast, mit maximal 3,0 Vol % CO_2.

Die Synchronisation erfolgte durch Licht-Dunkel-Wechsel von 14 : $\overline{10}$ Std und tägliche Verdünnung auf (wenn nicht besonders erwähnt) relative Zellzahl 100 (= $1{,}56 \cdot 10^6$ Zellen pro ml) nach den Angaben von LORENZEN (1957, 1963). Die Temperaturbehandlungen erfolgten in einer speziellen Temperaturkuvette (Eigenbau des Institutes), deren technische Ausrüstung es gewährleistete, daß die Temperaturschwankungen nicht mehr als $\pm$ 0,1° C betrugen. Für die kurzen Schocks kam eine Aufheizapparatur zur Anwendung, die es erlaubte, 5 100 ml Kulturröhren gleichzeitig zu behandeln.

2. Methoden

a) Der Kohlenhydratgehalt wurde nach ROE (1955) mit Anthron photometrisch bei 620 nm im Zeiss-Spektralphotometer PMQ 2 bestimmt.

b) Der Gesamtstickstoff wurde nach der Mikrokjeldahl-Methode festgestellt. Der erhaltene Wert von verbrauchten ml n/200 H_2SO_4 wurde auf Stickstoff umgerechnet. Mit dem Faktor 6,25 multipliziert erhält man das Gesamtprotein.

c) Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach MC'KINNEY (1941) Die abzentrifugierten Algen wurden 30 min lang mit abs. Methanol bei 60° C extrahiert und der Extrakt dann bei 650 nm und

665 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte nach:

$E_{650} \cdot 2{,}55 \cdot 10^{-2} + E_{665} \cdot 0{,}4 \cdot 10^{-2}$ = mg Chlorophyll pro ml.

d) Zellzählungen wurden mit Zählkammern nach THOMA (neu) durchgeführt.

e) Die Messungen der O_2-Produktion und des O_2-Verbrauchs wurden mit einer polarographischen Elektrode durchgeführt. Diese war mit einem Oxygen Monitor der Fa. YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS verbunden. An den Monitor war ein Schreiber des Typs Servogor (Fa. KIPP und ZONEN) angeschlossen. Die Algenprobe von 5 ml wurde in eine Plexiglaskuvette eingefüllt, die durch einen Wassermantel über einen Thermostaten auf der gewünschten Temperatur gehalten wurde (meist 32° C). Ein Magnetrührer verhinderte das Absetzen der Algen und sorgte für einen kontinuierlichen O_2-Austausch an der Teflonmembran. Die in der Kuvette blasenfrei verschlossenen Algen wurden im Dunkeln 3 min an die Temperatur adaptiert. Die Belichtung erfolgte mit einer Lampe des Typs Philips 15 V 150 W Halogen Reflektor Lampe. Das Gerät wurde mit luftgesättigtem Wasser geeicht. Bei Aufnahme von Lichtsättigungskurven wurde die Intensität durch das Vorschalten von Graufiltern der Firma BALZERS GmbH stufenweise variiert.

f) Messungen der Photosystemreaktionen erfolgten an Chloroplastenbruchstücken. Die Präparation aus den synchronen Kulturen wurde in Anlehnung an BERZBORN und BISHOP (1972) nach KOK et al. (1965) durchgeführt. Dabei konnte der Befund von KOK et al. bestätigt werden, wonach die Aktivität der Fragmente deutlich geringer war, wenn der Aufschlußpuffer Saccharose enthielt. Der Testansatz für PS I enthielt in Anlehnung an HARNISCHFEGER (1970) und HALLIER und PARK (1969) als Donator das DCPIP / Ascorbat System und als Acceptor Methylrot. Gemessen wurde die Methylrotreduktion. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Glukose	$1{,}4 \cdot 10^{-4}$ M	DCMU	10^{-8} M
Katalase	200 µg	Methylrot	$3 \cdot 10^{-7}$ M
Glukoseoxidase	66 µg	NH_4Cl	10^{-2} M
DCPIP	10^{-7} M	Extrakt	0,2 ml
Ascorbat	$2 \cdot 10^{-5}$ M pH 6,8	Puffer	auf Endvolumen von 3 ml Saccharose-Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,0 auffüllen.

Die Durchführung erfolgte in Thunbergkuvetten, die über einen Dreiwegehahn mit einer Wasserstrahlpumpe mehrfach entlüftet und aus einem Ballon mit N_2 aufgefüllt wurden. Durch Schütteln der Kuvetten wurde das N_2 gelöst. Weiter wurde durch die Glukoseoxidase und Katalasereaktion ein anaerobes Arbeiten sichergestellt. Gemessen wurde bei 430 nm vor und am Ende der Belichtung; als molarer Extinktionskoeffizient für Methylrot wurde hier $17 \cdot 10^3$ benutzt (HARNISCHFEGER 1970). Der Testansatz für das PS II enthielt:

DCPIP	0,2 µM
$MgCl_2$	10 µM
NH_4Cl	10^{-2} M
Extrakt	0,2 ml

mit TES Puffer 5 uM auf 3 ml aufgefüllt (pH 7,0).

Dieser Test wurde aerob mit H_2O als Donator und DCPIP als Acceptor durchgeführt. Der molare Extinktionskoeffizient für DCPIP ist $20 \cdot 10^3$ (ARMSTRONG 1964). Die Messung erfolgte bei 600 nm vor und nach der Belichtung. Diese erfolgte mit einer Lampe des Typs Philips Photolux 120 500 W durch ein Rotfilter der Fa. SCHOTT 620 nm. Als Wärmeschutz war ein Wasserbad und ein Wärmeschutzfilter KG 1 (SCHOTT) dazwischengeschaltet. Die eingestrahlte Energie betrug $1,46 \cdot 10^5$ erg/sec cm^2.

Die Meßwerte wurden um den Blindwert und die Dunkelkontrolle korrigiert und in µMol Umsatz/mg Chlorophyll : Std umgerechnet. Die Energiemessung erfolgte mit einem Ergmeter der Fa. YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS.

g) Die Bestimmung der Gesamtlipide erfolgte in Anlehnung an BLIGH und DYER (1959) nach folgendem Verfahren. Die Algen wurden in der Bühler Mühle der Fa. BRAUN, Melsungen, mit Glasperlen (Ø 0,25 - 0,3 mm) aufgeschlossen und mit einer Fritte abgetrennt. Das Homogenat wurde dann in 15 ml $CHCl_3$: CH_3OH (1:2 v/v) 5 min geschüttelt. Nach Zugabe von 10 ml H_2O und 10 ml $CHCl_3$ wurde je 1 min geschüttelt. Die $CHCl_3$-Phase wurde nach der Zentrifugation (2 min bei 3500 Upm) abgetrennt und durch Filtration von Zellresten und ausgefallenem Protein gesäubert.

Diese Phase wurde dann im Rotationsverdampfer bei 65° C zur Trockene eingeengt. Dabei war es notwendig, ein Azeotrop (Benzol:Äthanol 10:1 v/v) zur Entfernung des Restwassers zu benutzen. Dazu wurde bei 80° C gearbeitet. Der Trockenextrakt wurde in 1-2 ml $CHCl_3/CH_3OH$ (2:1 v/v) gelöst und in den Bestimmungstest nach BOEHRINGER eingesetzt. Die Messung erfolgte bei 530 nm. Die Werte wurden um den Blindwert und einen Blindwert, der H_3PO_4 und Extrakt enthielt (Vanillin ist in H_3PO_4 gelöst), korrigiert.

h) Das Gesamtphosphat und die Phosphatfraktionen wurden in Anlehnung an PIRSON und KUHL (1958) bestimmt. Das Gesamtphosphat wurde nach Veraschen der Algen mit H_2SO_4 und 30 % H_2O_2 in folgendem Test bestimmt.

1 ml Extrakt

3 ml $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$ 0,5 % in 1 n H_2SO_4

1 ml Ascorbinsäure 0,5 %

wurden 3 min im Wasserbad gekocht und mit kaltem Wasser abgestoppt. Die Messung erfolgte bei 720 nm gegen eine Blindprobe und Standard. 1 γ Phosphor / 5 ml Meßlösung entspricht $E_{720} = 0{,}074$. Die Fraktionierung erfolgte nach:

1. Gesamtes labiles Phosphat:
Ausgangssuspension mit 5 ml 1 N HCl bei 100° C 7 min hydrolysiert, scharf abzentrifugiert. Der Überstand wird zur Phosphatbestimmung wie oben benutzt. Falls nach dem Kochen eine Trübung auftritt (PIRSON und KUHL 1958), wird diese scharf abzentrifugiert.

2. Gesamtes säureunlösliches Phosphat:
Die Ausgangssuspension wurde 20 min mit 5 ml 5 % TCA im Eisbad extrahiert und abzentrifugiert. Der Rückstand wurde mit H_2SO_4 verascht und wie oben weiter behandelt.

3. Säureunlösliches labiles Phosphat:
Die Ausgangssuspension wurde wie 2 extrahiert und der Rückstand mit 1 N HCl bei 100° C hydrolysiert. Danach wurde wie 1 weiter verfahren.

i) Zur ATP-poolbestimmung wurden die Algen mit einer automatischen Pipette aus der Kultur entnommen und sofort in heißes Methanol (60° C) eingespritzt. Dieser Vorgang dauerte ca. 6 sec. Um einen Temperatursturz zu vermeiden, wurden 2 ml Suspension zu 8 ml Methanol gegeben. Nach 10 min Extraktion wurden die Proben in Eis gestellt und möglichst bald im Rotationsverdampfer bei 68° C fast bis zur Trockene eingeengt. Es war möglich, diesen Vorgang so zu standardisieren, daß das Restvolumen stets gleich war. Nachdem so das Methanol entfernt worden war, wurden die Proben mit 0,1 M Glycin / NaOH Puffer pH 9,2 auf ein konstantes Volumen gebracht. Davon wurde 1 ml in den Test eingebracht.

Als Testsystem wurde das Luziferin-Luziferase System (MC'ELROY und SELINGER 1966, STREHLER 1970, STREHLER und TROTTER 1972) in Abänderung nach KRAPF (1971) benutzt und wie folgt verfahren: 30-45 mg Feuerfliegenabdomen (Photinus pyralis) der Fa. SIGMA wurden im Mörser mit Seesand staubfein zerrieben und mit 10 ml eiskaltem 0,1 M NaH_2AsO_4/H_2SO_4 Puffer pH 9,2 extrahiert und sofort 15 min bei 38 000 g 0° C abzentrifugiert. Der Gang wurde mit 10 ml Puffer wiederholt und die Überstände vereinigt. Je nach der Aktivität konnte Rohextrakt, der 6-8 Std bei 0° C aufbewahrt wurde, um das endogene ATP zu verbrauchen, auf 400-600 ml mit Puffer aufgefüllt werden. Der Testansatz bestand aus:
5 ml Extrakt, 0,1 ml 1 M $MgSO_4$, 1 ml Algenextrakt.
Die Ansätze befanden sich vor der Messung 10 min im Scintillationszähler (NUCLEAR CHICAGO MARK I7). Der Algenextrakt wurde stets im gleichen Abstand zum Ansatz gegeben, ehe die Zählung begann. Alle Proben wurden gleichmäßig geschüttelt (durch O_2 wird Luziferin in Dehydroluziferin überführt, vgl. RHODES und MC'ELROY 1958) und dann 0,2 min gezählt. Die Aktivität wurde so eingestellt, daß bei Zusatz von 1 ml ATP Lösung (0,4 γ) $64 \cdot 10^3$ counts/0,2 min erreicht wurden. Die Meßwerte wurden im Vergleich mit einer in gleicher Weise behandelten Eichreihe ausgewertet. Die Eichreihe bestand aus einer Verdünnungsreihe von ATP in dem der Probe entsprechenden Lösungsmittel und war so abgestuft: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 $\cdot 10^{-6}$ g ATP / ml. In diesem Bereich besteht Linearität zwischen Zählrate und ATP-Gehalt. Die eingesetzten Proben überschritten

die Werte der Eichreihe nicht, oder sie wurden entsprechend verdünnt.

k) Auch für die Bestimmung des ADP sollte das für die ATP-Bestimmung benutzte System angewandt werden. Dazu wurden die Proben wie oben ausgeführt behandelt und dann ein Aliquot abgenommen. Im verbleibenden Rest wurde das ATP wie beschrieben bestimmt. Das Aliquot wurde mit Phosphorenolpyruvat und Pyruvatkinase (PEP und PK) 30 min bei 25° C inkubiert und dann im Eis bis zur Messung wie für ATP aufbewahrt.

Das im Extrakt vorhandene ADP wurde durch die Reaktion

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

zu ATP ungesetzt und somit als Differenz zwischen dem ATP-Wert und dem ATP + ADP-Wert meßbar.

Ehe mit dieser Methode gearbeitet werden konnte, wurden mit STEUP (1974) verschiedene Voruntersuchungen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß die eingesetzte PK keine Fremdaktivität an Adenylatkinase enthielt. Weiter wurde die eingesetzte Menge an PK im Verhältnis zum PEP und die Relation von ATP / ADP in verschiedenen Eichkurven getestet. Die Umsätze waren in einem weiten ATP / ADP Bereich gleich quantitativ über die gesamte Eichreihe.

Da in der Präparation der Algenproben ein Destillationsschritt enthalten war, wurde dieser in seinem Einfluß auf die Ausbeute an eingesetztem ADP untersucht. Dazu wurden die folgenden Ansätze pipettiert und wie Proben behandelt.

1. Algen
2. Algen + ATP ($0{,}14 \cdot 10^{-6}$ g/ml)
3. Algen + ATP + ADP "
4. Algen + PK + PEP
5. Algen + PK + PEP + ATP "
6. Algen + PK + PEP + ATP " + ADP
7. Algen + PK + PEP + ADP
8. Algen + ADP

Die ADP-Menge war so eingestellt, daß in Folge des äquimolaren Umsatzes $0{,}14 \cdot 10^{-6}$ g / ml ATP mehr in den Ansätzen, in denen die PK-Reaktion ablief, zu erwarten war. Die Ansätze enthielten alle Algenextrakt, da auch geprüft werden sollte, ob etwaige

Umsätze mit ADP oder ATP ablaufen und das Ergebnis verfälschen. Das Säulendiagramm (Abb. 2) und die Tabelle verdeutlichen das Ergebnis dieses Vorversuches.

eingesetzte Menge an ATP / ml	gemessene Menge an ATP / ml	Ausbeute %	Ansatz
------	0,155	------	1
0,14	0,115	82	2
0,14	0,119	86	3
------	0,240	------	4
0,14	0,122	88	5
0,28	0,281	101	6
0,14	0,127	91	7
------	0,156	------	8

Tab. 1 Ausbeute an ATP das verschiedenen Versuchsansätzen zugegeben wurde. Ansätze siehe Text.

Wie man erkennt, hält sich der Verlust, der durch das Destillieren und die Handhabungen beim Ernten der Algen im Vergleich mit der eingesetzten undestillierten ADP-Menge in den Grenzen, die auch bei der ATP-Bestimmung allein hingenommen werden mußten. Dieser Verlust wurde aber als verfälschende Fehlerquelle durch den Bezug der erhaltenen Werte auf eine stets mitbehandelte Eichreihe eliminiert, wie es auch bei der Bestimmung des ATP beschrieben wurde. Die Differenz zwischen destillierten und nicht destillierten Proben war auf Grund der Standardisierung des Verfahrens konstant, wie auch STEUP (1974) zeigen konnte. Wie aus dem Vergleich der Ansätze 2 und 3 zu erkennen ist, hat möglicherweise in den Luziferinextrakten enthaltenes Adenylat keinen spürbaren Einfluß auf die Meßergebnisse.

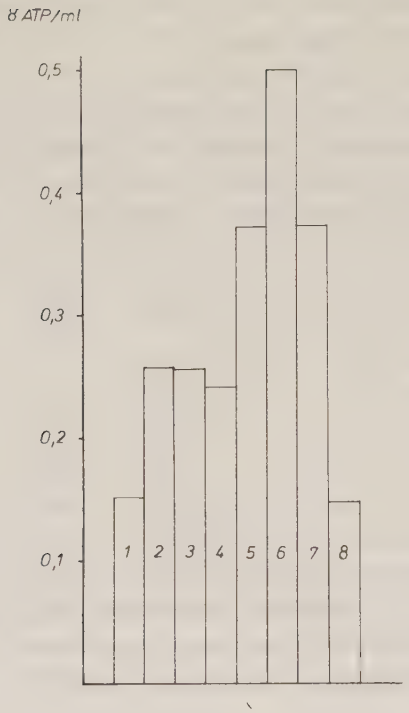

Abb. 2: Gehalt an ATP in Algenproben, die verschiedene Zusätze enthielten (siehe Text).

1) Die Tieftemperaturspektren wurden in Anlehnung an SHIBATA (1959) in einem Doppelstrahlspektrophotometer MPS-50 L der Firma SHIMADSU aufgenommen. Die Algen wurden dazu in der Bühler Mühle (s.o.) zertrümmert. Diese Suspension wurde dann in Plexiglaskuvetten von 1 oder 2 mm Schichtdicke gebracht und sofort durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Durch Variation der Suspensionsdichte wurden verschiedene Proben auf gleiche Extinktion bei einer Bezugswellenlänge eingestellt. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Vergleich der Wellenlängen,an denen die charakteristischen Maxima und Schultern auftraten. Intensive Kurvenanalysen waren aus technischen Gründen nicht möglich.

m) Die Farblichtbehandlung der Kulturen wurde in der bei ANDERSAG (1972) beschriebenen Apparatur durchgeführt. Die Lichtenergie wurde wie oben erwähnt gemessen. Im Blaubereich wurde mit 4 HPL-Lampen mit Leuchtstoff 250 W Typ 57220 G/97, im Rot mit 3 Comptalux-Lampen (Philips 235 V / 150 W E 27 Typ 13218 E 44 belichtet.

E R G E B N I S S E

I. Einwirkung von hohen Temperaturen über längere Zeit in Abhängigkeit vom Zellalter

Die Anzucht von Chlorella pyrenoidosa bei Temperaturen über 32° C während des gesamten Licht-Dunkel-Wechsels hat, wie in vielen Arbeiten gezeigt wurde (LORENZEN 1961, 1963; TISCHNER und LORENZEN 1974), negative Einflüsse auf den Zyklus (Verlängerung der Generationsdauer) und die Produktionsfähigkeit der Algen. Dagegen ist es möglich, die Substanzproduktion der Kulturen etwas zu erhöhen oder in einigen Fällen gegenüber der Kontrolle nicht abfallen zu lassen, wenn die Temperatur nur kurzfristig erhöht wird. Durch Wechsel zwischen 32° C und 39° C ist sogar eine Steigerung der Produktion möglich; der optimale Zeitpunkt des Temperaturwechsels ist vom Entwicklungszustand der Kulturen abhängig. So erreichen Kulturen, die nach 2 Std. 32° C für den Rest der Lichtzeit in 39° C verbleiben, am Ende des 14 : $\overline{10}$ LDW den Kontrollwert nicht (Abb. 3). Als Maß für die Produktion dient der Chlorophyllgehalt. Demgegenüber wird der Kontrollwert (32° C Dauertemperatur) schon durch einen Wechsel nach 4 Std. bei 39° C überschritten. Die im Temperaturwechsel gezogenen Algen erreichen das Optimum der Produktion, das ungefähr 30 % über der Kontrolle liegt, nach 6 Std. Wachstum in 32° C. Ein späterer Temperaturwechsel führt bis zur 10. Std. des Zyklus zwar noch zu Werten, die über der Kontrolle liegen, aber schon wenig später beeinträchtigt dieser Wechsel die Produktion.

Ein Verbleiben der Kulturen in der hohen Temperatur während der 10 Std. Dunkelheit hat keinen weiteren negativen Einfluß auf den Chlorophyllgehalt, was deutlich macht, welch schonende Anzucht im LDW gegenüber einer DL-Anzucht erreicht wurde. Bei den bisher erwähnten Temperaturwechseln wurden die Kulturen stets von 32° C in 39° C gebracht. Verfährt man in umgekehrter Weise, ist eine Produktionssteigerung beim Chlorophyllgehalt nicht möglich. Der Kontrollwert (32° C Dauertemperatur) wird nie erreicht, stets ergibt sich eine fallende Kurve. Dabei ist im Bereich von 2-9 Std. 39° C Vorbehandlung der Abfall nicht sehr stark, erst nach mehr als 9 Std. in 39° C ergibt sich ein

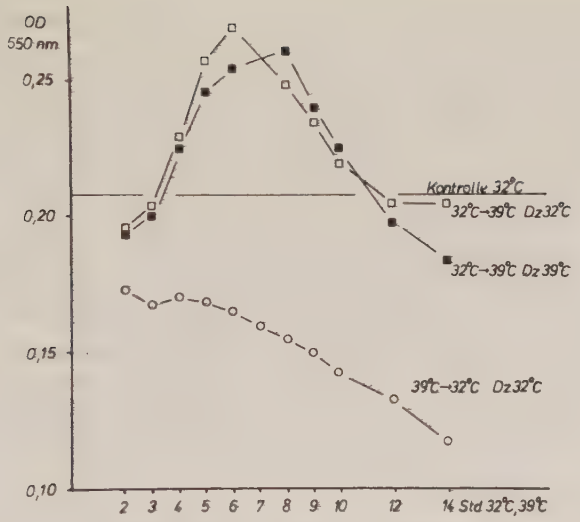

Abb. 3: Chlorophyllgehalt von Kulturen, die vom Beginn —— o —— an oder nach 32° C Voranzucht —— □ ——, —— ■ —— während der Lichtzeit verschieden langen 39° C Behandlungen ausgesetzt waren, am Ende des LDW.

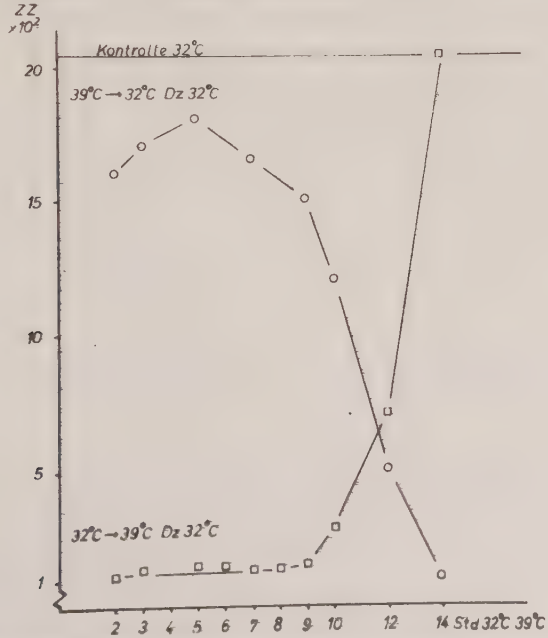

Abb. 4: Zellzahl von Kulturen, die vom Beginn an —— o —— oder nach 32° C Voranzucht —— □ —— während der Lichtzeit verschieden langen 39° C Behandlungen ausgesetzt waren, am Ende des LDW.

steiler Abfall der Kurve, die restliche Lichtzeit in 32° C hat keinen positiven Effekt mehr.

Die Reihenfolge der Temperatureinwirkungen hat also entscheidenden Einfluß auf die Chlorophyllproduktion. So werden 30 % Steigerung gegenüber der Kontrolle bei einem Wechsel 6 Std. 32° C / 8 Std. 39° C verzeichnet, während der 6 Std. 39° C / 8 Std. 32° C Wechsel eine um 20 % verringerte Produktion zur Folge hat. Im ersten Fall trifft die Temperaturerhöhung stets auf ein schon gestartetes, produzierendes System, das stabiler ist und durch Temperaturerhöhungen (Veränderungen von exogenen Faktoren) beschleunigt werden kann. Dagegen ist es dem System scheinbar unmöglich, bei hoher Temperatur beschleunigt zu starten und die Phase geringerer Chlorophyllproduktion zu Beginn des Zyklus zu verkürzen.

Bezieht man die Autosporenproduktion in die Betrachtung mit ein (Abb. 4), ergibt sich folgendes Bild. Bei Voranzucht bis 9 Std. in 32° C hat die Anwendung der höheren Temperatur eine Hemmung der Freisetzung zur Folge. Nach 10 Std. 32° C haben am Ende des Zyklus wenige Mutterzellen sporuliert; die Kultur besteht fast völlig aus Maulbeerstadien. Die Kultur mit 12 Std. 32° C Vorbehandlung ist am Ende des LDW vollsynchron, aber die Zellzahl liegt deutlich unter der der Kontrolle. Wird die Temperaturbehandlung in der umgekehrten Reihenfolge vorgenommen, so bleiben die Kulturen mit bis zu 9 Std. 39° C Vorbehandlung synchron und setzen eine stets fallende Zahl von Tochterzellen frei. Der Kontrollwert wird nie erreicht. Ab 9 Std. bei 39° C werden die Kulturen desynchronisiert, und ab 12 Std. 39° C Vorbehandlung bleiben sie trotz erheblicher Produktion ungeteilt. Bei diesen Versuchen wurde die Dunkelzeit immer in 32° C verbracht, da die Dunkelzeit bei 39° C eine Zellteilung in jedem Fall verhindert.

Hinsichtlich der Höhe der Autosporenproduktion ergibt sich so ein Zeitpunkt um die 9. Std. des Zyklus, von dem ab die Schädigung durch die hohe Temperatur irreversibel ist, wenn sie zuerst einwirken kann. Weiterhin reicht eine 32° C Voranzucht bis zu 9 Std. nicht aus, um am Ende des Zyklus Freisetzungen zuzulassen, wenn die restliche Lichtzeit in 39° C verbracht wird.

Durch Temperaturwechsel in der beschriebenen Weise ist es also nicht möglich, die Autosporenproduktion in ähnlichem Umfang zu erhöhen, wie das für die Chlorophyllausbeute gelang. Das zeigt, daß die Kulturen nicht mehr koordiniert synthetisieren können, wie das bei der Temperatur von 32° C der Fall ist.

Erhöht man die Einwirkungstemperatur vom Beginn der Lichtzeit an auf 41° C, zeigt sich für den Chlorophyllgehalt ein wesentlich schnellerer Produktionsabfall als bei 39° C. Aber es ist noch möglich, die Kontrolle zu erreichen, wenn ein Verhältnis von zunächst 8 Std. 32° C und danach 6 Std. 41° C Einwirkung gewählt wird (Abb. 5).

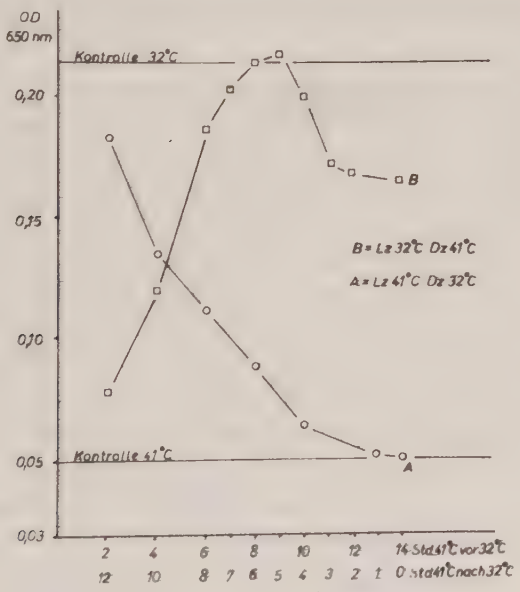

Abb. 5: Chlorophyllgehalt von Kulturen, die vom Beginn an —— o —— oder nach 32° C Voranzucht —— □ —— während der Lichtzeit verschieden langen 41° C Behandlungen ausgesetzt waren, am Ende des LDW.

Betrachtet man die Autosporenproduktion, so zeigt sich, daß bis zur 6. Std. bei 41° C vor 32° C noch Teilungen stattfinden. Bei 8 Std. 41° C liegen am Zyklusende Teilungsstadien vor, ab 10 Std. 41° C sind die Zellen zwar so groß wie Mutterzellen, zeigen aber kein Zeichen von Teilungsbereitschaft. Bei umgekehrter Temperaturanwendung findet nie eine Zellteilung statt. Im ersten Fall kann die hohe Temperatur den Zellteilungsmechanismus verzögern und die Produktionsfähigkeit herabsetzen. Wahrscheinlich ist die Synthese von DNA-Vorstufen in den ersten Lichtstunden gehemmt, denn ab der 6. Std. des Zyklus findet man in der Normalkultur den Beginn der DNA-Synthese (RUPPEL 1962). Dagegen ist bei einer Anzucht bei 41° C nach 32° C noch bei einem Verhältnis 10 Std./32° C : 4 Std./41° C der Teilungsmechanismus geschädigt, denn eine Produktion von DNA-Vorstufen ist möglich.

Um den Syntheseverlauf des Chlorophylls bei der Anwendung von Temperaturwechseln über den LDW zu verfolgen, wurden Analysen direkt vor dem Wechsel, zum Ende der Lichtzeit und am Ende des Zyklus durchgeführt. Dabei zeigte sich bei 41° C Anwendung von 32° C (Abb. 6), daß nach 8 Std. Hitze in der restlichen Lichtzeit (bei 32° C) zwar ein Chlorophyllzuwachs stattfindet, jedoch zeigt der Wert am Ende des Zyklus, daß in der Dunkelzeit (32° C) ein mächtiger Syntheseschub zu verzeichnen ist. Dieses Verhalten war bei 10 Std. und 12 Std. Hitze ebenfalls zu beobachten. Aber in beiden Fällen nahm die Produktion in der restlichen Lichtzeit (32° C) und in der anschließenden Dunkelzeit (32° C) bei weitem nicht so stark zu. Wurde die gesamte Lichtzeit in 41° C verbracht, geb es in der Dunkelzeit (32° C) keine Veränderung mehr.

Erfolgte die Anwendung von 41° C nach der 32° C Anzucht (Abb. 7), so ergab sich, daß nach 8 Std. 32° C und dem Rest der Lichtzeit in 41° C in dieser eine Chlorophyllsynthese erfolgt. Der Chlorophyllgehalt dieser Kulturen liegt am Ende der Lichtzeit über dem der Kontrolle. In der anschließenden Dunkelzeit (32° C) erfolgt nur ein geringer Zuwachs, aber am Ende des Zyklus liegt der Gehalt noch über dem der Kontrolle. Das eben Gesagte gilt auch für 10 Std. 32° C Voranzucht; es werden nur unwesentlich geringere Werte erreicht.

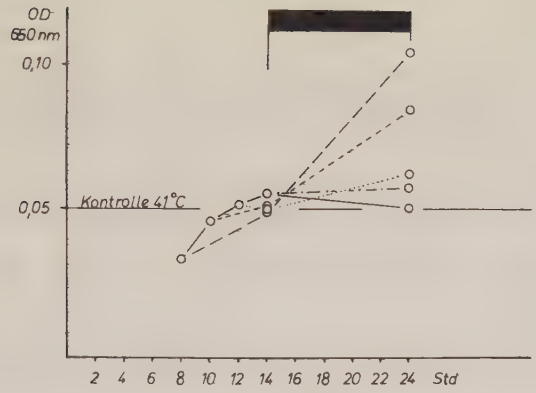

Abb. 6: Chlorophyllgehalt von Kulturen, die vom Beginn der Lichtzeit an verschieden lange 41° C ausgesetzt waren. Messungen beim Umhängen, am Ende der Lichtzeit und am Ende des LDW.
— — — — 0.- 8. Std. 41° C —·—·—·— 0.-14. Std. 41° C
- - - - - - - - 0.-10. Std. " ———— Kontrolle "
..... 0.-12. Std. "

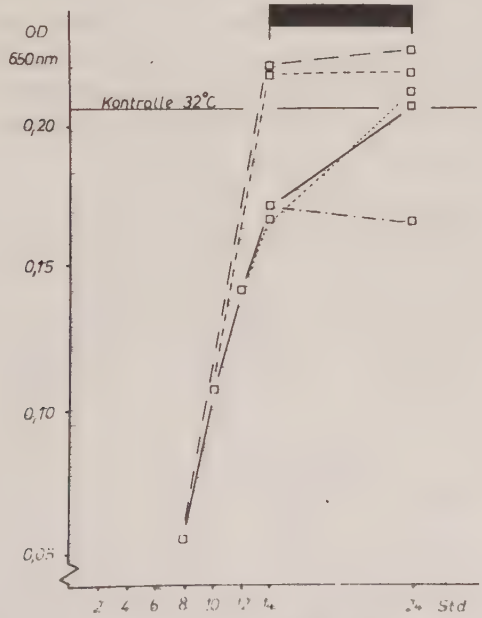

Abb. 7: Chlorophyllgehalt von Kulturen, die nach verschieden langer Anzucht bei 32° C bis zum Ende der Lichtzeit 41° C ausgesetzt waren. Messungen beim Umhängen, am Ende der Lichtzeit und am Ende des LDW.
— — — — 8.-14. Std. 41° C —·—·—· 14.-24. Std. 41° C
- - - - - - - 10.-14. Std. " ———— Kontrolle 32° C
..... 12.-14. Std. "

Wird die Hitzebehandlung in der 12. bis 14. Std. des Zyklus vorgenommen, so ergibt sich kaum ein Unterschied gegenüber der Kontrolle. Interessant ist, daß bei dieser Kultur der Zuwachs in der Dunkelzeit dem der Kontrolle entspricht und wesentlich größer ist als in den beiden vorher erwähnten Kulturen.

Wird die gesamte Lichtzeit in 32° C und die Dunkelzeit in 41° C verbracht, führt das zu leichtem Chlorophyllverlust während der Dunkelzeit. Das zeigt noch einmal deutlich die stärker schädigende Wirkung von 41° C gegenüber 39° C auf. Diese Kulturen sehen deutlich blasser aus, und ihre Farbe scheint nach Gelb verschoben, was auf einen relativ höheren Carotinoidanteil an der Pigmentgarnitur deuten könnte.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

a) Hitze vom Lichtbeginn an gegeben wirkt stets schädigend. Dabei behindert Licht nach der Hitzegabe die Synthese von Chlorophyll. Schließt sich an die Hitzebehandlung Dunkel an (bei 32° C), so erfolgt eine Synthese, teilweise ein starker Schub. Möglicherweise werden bereits vorhandene Vorstufen verarbeitet. Das Regenerationsvermögen der Chlorophyllsynthese nach 12 Std. Hitze ist gering.

b) Hitzegabe nach 32° C bis zur 8.-10. Std. des Zyklus wirkt für die Chlorophyllsynthese fördernd. Es werden am Ende des Zyklus (Dunkelzeit bei 32° C) die Kontrollwerte in etwa erreicht. Die Hauptsynthese liegt dabei in der Zeit der Hitzebehandlung selbst. Spätere und damit kürzere Hitzegaben haben keinen steigernden Effekt mehr. Dunkelzeit bei 41° C führt zu Chlorophyllverlusten.

Die oben erwähnten Farbveränderungen der Algenkulturen bei langer Anzucht in höheren Temperaturen sowie die festgestellte Verschiebung des Quotienten E_{665} / E_{470} (Tab. 2), der als Maß

NK	41°C	2x 41°C
0,867	0,600	0,472

Tab. 2 Erklärung siehe Text

für das Verhältnis Chlorophyll / Carotinoide genommen wurde, verlangten eine Untersuchung durch Aufnahme von Spektren. Dazu wurden die Algen wie zur Chlorophyllbestimmung behandelt und die Extrakte im Leitz-Unicam im kontinuierlichen Spektrum gemessen. Dabei wurde, um die Veränderungen direkt ablesen zu können, die Dichte bei 665 nm von allen Proben auf denselben Wert eingestellt. Wie aus Abb. 8 zu erkennen ist, liegt bei sehr langer Anzucht von 24 bis 48 Std. in höherer Temperatur deutlich eine Zunahme des Carotinoidgehaltes bei gleichem Chlorophyllgehalt vor. Es wurden hier nur die Werte von den Kulturen

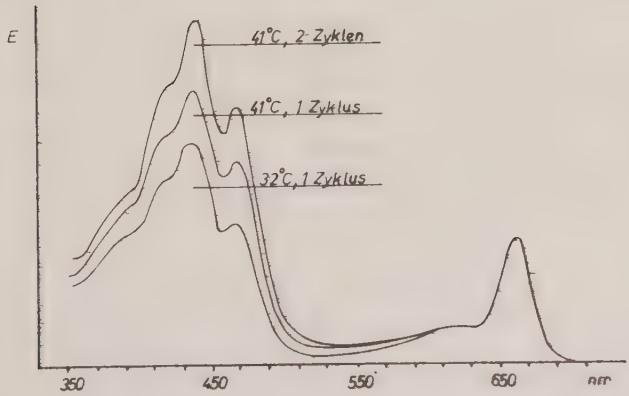

Abb. 8: Vergleich des Blaubereichs des Gesamtpigmentspektrums von verschieden lange 41° C behandelten Kulturen mit der Normalkultur am Ende des LDW. $E_{665\ nm}$ wurde auf den gleichen Wert eingestellt.

abgebildet, die dauernd in der entsprechenden Temperatur verweilten, da hier die Unterschiede besonders ins Auge fielen. Aber auch bei den im Temperatur-Wechsel gezogenen Kulturen war diese Verschiebung zu bemerken. Interessanterweise war die Veränderung dort, wo die hohe Temperatur zuerst gegeben wurde, stärker.

Um die für die 41° C nach zwei Zyklen geschilderten Pigmentverschiebungen zu untermauern, wurden die Algen einer Fettsäureanalyse im Gaschromatographen unterworfen. Dabei wurde nach HEISE (1972) verfahren und die Flächen unter den einzelnen Maxima errechnet. Wie die Tab. 3 erkennen läßt, ergeban sich bei den gebundenen und den freien Fettsäuren deutliche Unterschiede zwischen der normal- und der hitzebehandelten Kultur.

Ng	Sg	Nf	Sf	
873	2321	1323	1904	$C_{14:0}$
----	19	----	85	$C_{14:2}$
6	60	30	68	$C_{14:3}$
338	105	51	175	$C_{16:0}$
46	12	----	3	$C_{16:1}$
7	2	----	28	$C_{16:2}$
4	1	3	72	$C_{18:0}$
233	9	22	301	$C_{18:1}$
88	132	127	280	$C_{18:2}$
520	3	----	60	$C_{18:3}$

Tab.3 Relative Anteile der Fettsäuren in der Normalkultur und 41°C-Kultur (Ng,Nf und Sg,Sf). Ng,Sg= gebundene, Nf,Sf= freie Fettsäuren.

Bei den gebundenen Fettsäuren fällt der hohe Gehalt an C 14:0 Säuren auf, was auf Spaltprodukte längerkettiger Fette hindeutet. Der geringe Gehalt an C 18:3 Fettsäuren, die vor allem in Galaktolipiden, den Membranen von Chloroplasten und evtl. Mitochondrien vorkommen, weist in der 41° C Kultur auf den Abbau des Thylakoidsystems der Chloroplasten hin. Bei den freien Fettsäuren findet man in diesen Kulturen viel mehr Maxima als in der Normalkultur, ein Zeichen für das vermehrte Auftreten von Spaltprodukten. Außerdem wird deutlich, daß diese Fettsäuren generell in größerer Menge vorliegen, was mit dem Befund von NESBAKKEN (1973) an Euglena übereinstimmt, der eine Zunahme von freien Fettsäuren nach Hitzebehandlung fand.

Die bisher geschilderten Versuche benutzten eine Aufteilung der Lichtzeit in zwei Abschnitte, in denen verschiedene Temperaturen unterschiedlich lange einwirken konnten. Um nun den Temperaturwechsel in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand in den synchronen Kulturen zu untersuchen, wurden gleichlange Abschnitte hoher Temperatur gegeben.

Es muß angemerkt werden, daß es sich nunmehr um Temperaturänderungen zwischen 0,5 - 8 Std. Dauer während der Lichtzeit handelt, die nicht als Schock zu bezeichnen sind. Dieser Begriff ist für reversible Temperaturerhöhungen im Minutenbereich zu gebrauchen.

Nach Temperaturen von 39° C, 41° C, 42° C und 43° C, in der oben beschriebenen Weise angewandt, wurde der Chlorophyllgehalt jeweils am Ende des Zyklus als Maß für die Produktion bestimmt. Die Dunkelzeit verbrachten alle Kulturen in der Normaltemperatur von 32° C.

Wie aus Abb. 9 zu ersehen ist, kann man durch 6 bis 8 Std. 39° C größere Produktionsgewinne erzielen. Dabei ist es beinahe gleichgültig, wann das zwischen der 1.-6. Std. des Zyklus geschieht. Diese beiden Befunde werden durch die Beobachtungen von LORENZEN (1963) gestützt. Verkürzt man die Einwirkung bis auf 0,5 Std., so wird die Kontrolle stets erreicht, aber der Einfluß ist geringer geworden. Bei allen Versuchen zeigt sich, daß um die 8. Std. des Zyklus eine Wachstumsphase liegt, die besonders gefördert wird.

Erhöht man die Temperatur auf 41° C (Abb. 10), sieht man, daß der Kontrollwert nur ganz knapp erreicht wird. Das ist bei allen Temperaturen nur um die 8. Std. der Fall, was die Wichtigkeit dieser Phase unterstreicht. Bei allen Behandlungen von 4 und 6 Std. zeigt sich die Beeinträchtigung der Chlorophyllproduktion zu Beginn des Zyklus besonders deutlich.

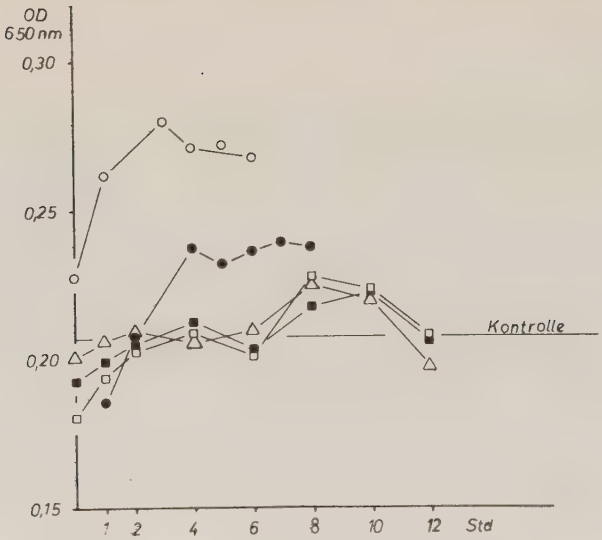

Abb. 9: Chlorophyllgehalt am Ende des LDW nach Anwendung unterschiedlicher Temperaturwechsel (32° C / 39° C) in der Lichtzeit des Zyklus. Die Abszisse gibt den Beginn der hohen Temperatur für die jeweils angegebene Dauer an.

—○—8 Std. 39° C —●—6 Std. 39° C —□—2 Std. 39° C
—■—1 Std. " —△—0,5 " "

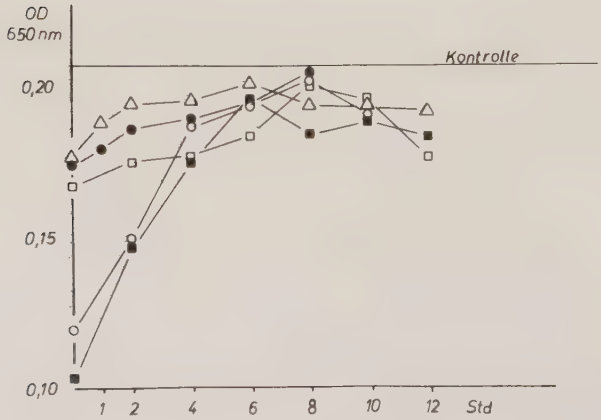

Abb.10: Chlorophyllgehalt am Ende des LDW nach Anwendung unterschiedlicher Temperaturwechsel (32° C / 41° C) in der Lichtzeit des Zyklus. Die Abszisse gibt den Beginn der hohen Temperatur für die jeweils angegebene Dauer an.

—●—6 Std. 41° C —○—4 Std. 41° C —□—2 Std. 41° C
—■—1 " " —△—0,5 " "

Eine weitere Erhöhung der Einwirkungstemperatur auf 42° C (Abb. 11) läßt nur noch Gaben von 0,5 - 2 Std. Dauer sinnvoll erscheinen. Bei 0,5 Std. wird um die 6. Std. fast der Kontrollwert erreicht, während bei 1 Std. und 2 Std. Gaben genau in dieser Phase ein Minimum der Produktion durchlaufen wird. Bei diesen Einwirkungszeiten wird auch deutlich, daß 1-2 Std. alte Autosporen nicht so stark beeinträchtigt werden wie wenig ältere.

Die Phase um die 6.-8. Std. des Zyklus scheint durch Veränderung exogener Faktoren besonders zu beeinflussen zu sein, was die Förderung oder Hemmung der Chlorophyllproduktion angeht.

Für kürzere Einwirkungszeiten bei 43° C (Abb. 12) trifft der oben angeführte Befund für junge Autosporen ebenso zu. Die Temperatur ist jedoch schon so hoch, und 0,5 Std. Einwirkungszeit so lang, daß der Verlauf um die 6. Std. keine Förderung, aber schon eine Hemmung erkennen läßt. Bei 4 und 6 Std. langen Gaben scheint sich diese Phase immer mehr zu verlieren, der schädigende Einfluß erfaßt immer weitere Bereiche des Stoffwechsels. Für 1 Std. Hitzebehandlung erhält man jedoch eine Kurve, die die Resistenz in der 1. Std. und die Empfindlichkeit in der 6. Std. des Zyklus klar erkennen läßt.

Wie diese Befunde deutlich machen, zeigt eine Temperaturerhöhung in diesem engen Bereich von 39° C - 43° C, daß die Beeinträchtigung der Chlorophyllsynthese erst bei 42° C deutlicher wird, wenn diese Temperatur in Abschnitten von mindestens 1-2 Std. gegeben wird (Abb. 9). Besonders groß ist der Unterschied zwischen 42° C und 43° C.

Die oben gezeigten Spektren ließen deutliche Pigmentveränderungen erkennen. Allerdings ist die Trennschärfe der einzelnen Pigmentbanden, besonders der der Chlorophylle nicht gut. Deshalb wurden Spektren bei einer Temperatur von -196° C aufgenommen, denn dabei ist es möglich, neben quantitativen auch qualitative Veränderungen der Pigmentgarnitur zu erfassen. Das Fehlen jeglicher Resonanz läßt das Spektrum für einige Pigmentformen schärfer werden, andere, besonders die im langwelligen Rot (684 nm, 695 nm) absorbierenden Formen sind schwierig zu erkennen, oder sie treten nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen deutlich auf. Ein Beispiel dafür

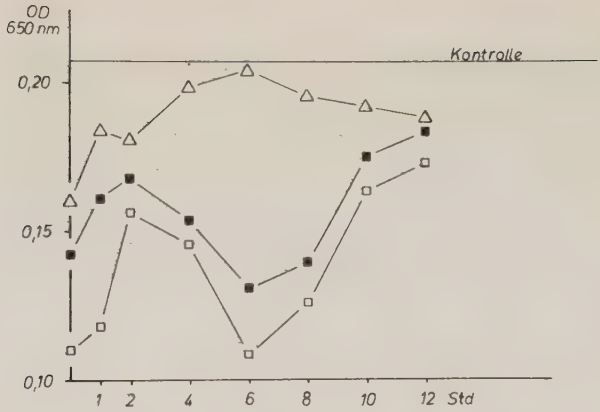

Abb. 11: Chlorophyllgehalt am Ende des LDW nach Anwendung unterschiedlicher Temperaturwechsel (32° C / 42° C) in der Lichtzeit des Zyklus. Die Abszisse gibt den Beginn der hohen Temperatur für die jeweils angegebene Dauer an.
—□— 2 Std. 42° C —■— 1 Std. 42° C —△— 0,5 Std. 42° C

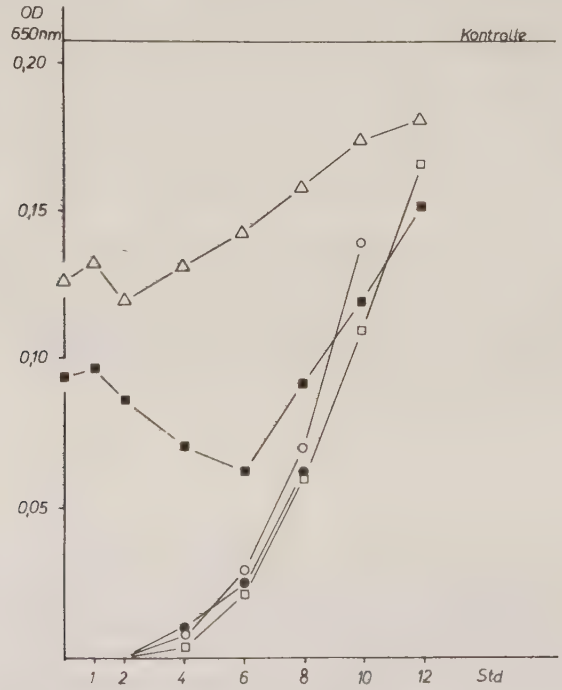

Abb. 12: Chlorophyllgehalt am Ende des LDW nach Anwendung unterschiedlicher Temperaturwechsel (32° C / 43° C) in der Lichtzeit des Zyklus. Die Abszisse gibt den Beginn der hohen Temperatur für die jeweils angegebene Dauer an.
—●— 6 Std. 43° C —○— 4 Std. 43° C —□— 2 Std. 43° C
—■— 1 " " —△— 0,5 " "

ist die Veränderung des Chlorophylls a 695 nm aus Chlamydobotrys beim Übergang von photoheterotrophen zu autotrophen Anzuchtbedingungen, die von WIESSNER und FRENCH (1970) beobachtet wurde.

Pigmente aus niederen und höheren Pflanzen können, wie es zur Aufnahme der oben erwähnten Spektren geschah, durch organische Lösungsmittel aus diesen extrahiert und dann chromatographisch aufgetrennt werden. So werden auch Chlorophyll a und b voneinander getrennt; Formen, die sich ebenfalls im Spektrum unterscheiden. Chlorophyll a zeigt ein Maximum im Roten bei 660 nm, und Chlorophyll b besitzt eines bei 645 nm. Beide Formen sind in vivo jedoch an Proteine, Lipoproteine und Lipide gebunden, so zeigen sie veränderte optische Eigenschaften. Generell lassen sich vor allem beim Chlorophyll a mehrere Formen unterscheiden, die mit extrahierten Pigmenten verglichen, deutlich zum langwelligen Bereich hin verschobene Maxima aufweisen. Die Messung in vivo ist jedoch durch zusätzliche Lichtstreuung erschwert, so daß besondere Einrichtungen erforderlich sind, um zu einer reproduzierbaren Aussage zu kommen. SHIBATA (1959) erarbeitet die sogenannte Opalglasmethode, um diese Streuung zu eliminieren. Man muß die Meßkuvetten auch möglichst dicht an den Photovervielfacher bringen und diese Störung so umgenen. Stets ist jedoch ein Arbeiten mit hohen Verstärkungen unumgänglich.

Mit der Aufnahme von Tieftemperaturspektren ist aber bei der Auswertung immer eine Kurvenanalyse notwendig, die anfangs mit Hilfe der Derivativspektroskopie von GIESE und FRENCH (1955), FRENCH (1957) und noch von MEISTER (1966) vorgenommen wurde. Dabei arbeitete man mit der ersten und zweiten Ableitung der Spektren und erhielt Hinweise auf die Zusammensetzung der Spektren aus Kurven mit streng getrennten Maxima. Die Analysenmethoden wurden dann so verbessert, daß mit Computern (vgl. auch FRENCH 1954) die Anzahl, Lage der Maxima und die Fläche der einzelnen Komponenten bestimmt wurden. Diese liegen jede für sich in der Gaußschen Normalverteilung vor und ergeben als Summe das aufgenommene Spektrum.

Für die weitere Auswertung bildeten sich drei Konzepte heraus (FRENCH 1970, 1971a):

1. constant component concept
2. extra component concept
3. variable component concept.

Die von FRENCH (1971a) benutzte Methode fordert die Konstanz der Wellenlänge der Komponenten, beschränkt jedoch die Weite der Verteilungskurven nicht. Extrakomponenten werden nur für den sehr langwelligen Teil des Spektrums angenommen, während der sonstige Kurvenverlauf mit vier Hauptkomponenten des Chlorophylls a und dem Chlorophyll b erklärbar ist. Insgesamt sind so im Rotbereich folgende Chlorophyllformen bekannt geworden:

nm	Chlorophyll	Eigenschaften im Spektrum
650	b	scharfes Maximum
663	a	leichte Schulter, lipidgelöst
670	a	starke Schulter, proteingebunden
678	a	scharfes Maximum, proteingebunden
684	a	Schulter nicht sichtbar, "
695	a	" " " "
706	a	leichte Schulter, Reaktionszentrum PS I

Tab. 4 Chlorophyllformen nach Computeranalyse, zusammengestellt nach FRENCH (1971 a). Oben vier Haupt- unten drei Extrakomponenten.

Durch Präparation mit Hilfe einer Saccharose-Gradienten-Zentrifugation gewannen MICHEL und MICHEL-WOLWERTZ (1968) zwei Fraktionen, von denen die erste nur PS I Aktivität, die zweite neben PS I viel PS II Aktivität aufwies. MACHOLD et al. (1971) erhielten durch Elektrophorese drei getrennte Banden, die PS I, PS II Aktivität und freies Chlorophyll enthielten. Durch die Auswertung der Tieftemperaturspektren solcher Fraktionen war es möglich, die einzelnen Chlorophyllformen ungefähr den Photosystemen zuzuordnen.

FRENCH et al. (1971b) teilen die Chlorophylle a 683 nm, 692 nm und 705 nm eher dem PS I und Chlorophyll a 670 nm und 677 nm eher dem PS II zu.

Der weitaus größte Teil dieser Chlorophylle hat neben anderen aceessorischen Pigmenten im Thylakoidsystem Kollektorfunktion. Weniger als 1 % liegt tatsächlich im Reaktionszentrum der Photosysteme vor.

Die Trennung der Bestandteile im Blaubereich wies besondere Schwierigkeiten auf. Denn hier überlagern sich Chlorophylle, Carotinoide und Xanthophylle. Außerdem spielen andere im Blaubereich absorbierende Komponenten mit, so mit relativ geringem Anteil Flavine und Ferredoxin. Deutlich sichtbare Schultern und Maxima lassen sich für Chlorella pyrenoidosa bei folgenden Wellenlängen nach MICHEL and MICHEL-WOLWERTZ (1969) erkennen: 417 nm, 438 nm, 477 nm, 486 nm, 495 nm.

In den Untersuchungen von WIESSNER et al. (1971) wurden die für Chlorella vulgaris zutreffenden Pigmentformen im Rotbereich korrigiert und festgelegt: 649,9 nm, 663 nm, 670 nm, 680 nm, 687 nm und 694 nm.

Für die folgenden Untersuchungen waren Analysen in der oben beschriebenen Weise nicht möglich, so daß sie sich auf Veränderungen an den Hauptmaxima und Schultern beschränken mußten. Tieftemperaturspektren wurden neben denen der 32° C Normalkultur von Zellen aufgenommen, die für einen LDW oder für zwei LDW 41° C ausgesetzt waren.

Weiter wurden Kulturen ausgewählt, die kurzzeitig der Temperatur von 45° C ausgesetzt waren. Über diesen 20minütigen Einfluß, der als längerer Schock zu bezeichnen ist, liegen Befunde bei LORENZEN (1963) vor. Zuerst sollen die Maxima und Schultern der Normalkultur betrachtet werden. Es ergaben sich:

nm	Eigenschaft	nm	Eigenschaft
413	Maximum	649	Maximum
420	Maximum	671	Schulter
439	Maximum	678	Maximum
477	Maximum	705	Schulter
486	Schulter	732	Schulter
496	Schulter		

Tab.5 Maxima und Schultern im Spektrum einer Normalkultur.

Die letzten beiden Schultern des Rotbereichs traten bei insgesamt acht Untersuchungen nur einmal so hervor, daß sie erfaßt werden konnten. Es ergibt sich so eine relativ gute Übereinstimmung mit den von WIESSNER (1971) gefundenen Banden, insbesondere, wenn man die unzureichenden Auswertungsmöglichkeiten berücksichtigt.

Eine quantitative Auswertung der Tieftemperaturspektren ist nicht möglich, da keine Absolutwerte gemessen werden. Doch kann man durch die Wahl einer geeigneten Bezugsgröße auch quantitative Veränderungen relativ ausdrücken. Dazu wurde der Bereich, in dem die Absorptionskurven keine Extinktionsveränderungen mehr aufwiesen, also parallel zur Basislinie verliefen, zur Nullinie bestimmt. Das war ab 720 nm der Fall. Dann wurde die nun meßbare Extinktion bei 678 nm gleich 100 gesetzt. Das Ergebnis ist in Tab. 6 dargestellt. Die drei Kolonnen rechts

nm	Normalk.	0.Std	1.Std	10.Std	41°C (24Std)
678	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
671	90,5	93,2	91,3	93,2	94,8
649	55,3	55,4	56,6	55,6	58,8
623	36,7	32,7	35,5	39,9	34,6
486	76,5	76,0	86,0	73,5	104,0
477	82,9	93,4	102,0	84,2	111,0
439	122,0	139,0	142,0	116,3	144,0
420	106,0	123,0	122,0	102,0	120,0

Tab. 6 Prozentuale Anteile verschiedener Pigmentformen auf E_{678} = 100 bezogen. Genauere Auswertung siehe Text. Die drei Kolonnen rechts von der Normalkultur gehören zu Kulturen, die in der genannten Std des LDW 20' 45°C (Dunkel) ausgesetzt waren.

von der Normalkultur zeigen Kulturen, die in den genannten Std. des Zyklus einem 20 min 45° C Dunkelschock ausgesetzt waren. Es wurden nur deutlich erkennbare Maxima und Schultern berücksichtigt. Zuerst sollte festgestellt werden, daß sich die Lage der Maxima bei allen Kulturen gegenüber der Normalkultur nicht verändert hat. Vergleicht man die relative Höhe der Extinktionen im Rotbereich, so finden sich für die hitzebehandelten Kulturen höhere Werte für die kurzwelligeren Formen des Chlorophyll a und ebenfalls leicht ernöht das Chlorophyll b Maximum. Aber die Unterschiede sind nur gering. Bezieht man den Blaubereicn in die Betrachtung mit ein, sieht man, daß sich hier vor allem für die in 41° C gezogenen Kulturen größere Abweichungen ergeben. Damit wird die schon aus der Interpretation der Unicam-Spektren gewonnene Erkenntnis gestützt (vgl. Abb. 8), die Verfärbung der bei 41° C gezogenen Algen bestätigt. Auch die 45° C geschockten Algen weisen diese Veränderung in ihrem Pigmentsystem auf. Am Grad der Veränderung läßt sich erkennen, daß die in der 10. Kulturstunde geschockten Algen nicht so stark beeinflußt werden wie die in der 0. bzw. 1. Std., die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden.

Noch zwei andere Versuche wurden durchgeführt; beim einen wurde der 20 min-Schock in der 6. Kulturstunde, dem Empfindlichkeitsmaximum (LORENZEN 1963, JASTER 1970) gegeben. Beim anderen wurden die Algen 48 Std., dh. 2 LDW in 41° C kultiviert. Die wie oben gewonnenen Werte zeigt Tabelle 7:

	678	671	649	486	477	439	420
6.Std 20'45°C	100	112	69	129	157	176	158
2 x LDW 41°C	100	119	72	121	148	229	253

Tab.7 Prozentuale Anteile verschiedener Pigmentformen auf E_{678} = 100 bezogen. Genauere Auswertung siehe Text.

Hier gibt es starke quantitative Veränderungen vor allem im Blaubereich, jedoch erreichen die Chlorophyllformen ebenfalls deutlich höhere Werte. Außerdem übertrifft der 671 nm-Wert den bei 678 nm. Diese beiden Ergebnisse müssen gesondert betrachtet werden. Der Bezugswert Chlorophyll a 678 nm tritt in beiden Fällen nicht mehr als deutliches Maximum auf.

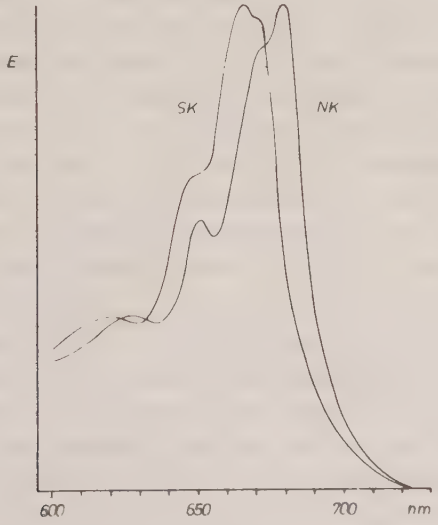

Abb. 13: Vergleich der Tieftemperaturspektren einer Normalkultur mit einer in der 6. Std. des Zyklus 20 min 45° C D geschockten Kultur.

Zuerst soll Abb. 13 betrachtet werden. Das bei 650 nm in der Normalkultur deutlich zu erkennende Maximum erscheint nur noch als Schulter. Weiter tritt bei längerer Wellenlänge eine Auftrennung in Schulter bei 671 nm und Maximum bei 678 nm nicht mehr auf. Vielmehr erscheint eine breite flache Kurve mit einer Umkehr des Erscheinungsbildes: nämlich erst Maximum bei 667 nm, dann Schulter bei 672 nm. Die Chlorophyllform, die bei der Normalkultur den Gipfel 678 nm bewirkte, ist so stark reduziert, daß sie mit der hier benutzten Auswertungsmethode nicht zu erkennen ist. Die Reduktion des Chlorophyll b Maximums wird vor allem auf dem Einfluß der stärker ausgeprägten Chlorophyllbanden 667 nm und 672 nm bei der Überlappung, die das Bild des Spektrums ausmacht, beruhen.

Diese Verschiebung der Banden liegt nicht an der höheren Zahl der Zellbruchstücke, die wegen des geringeren Chlorophyllgehaltes pro Zelle notwendig ist, wie BROWN (1969) bei Untersuchungen an heterotroph gewachsenen N_2-Mangelzellen von Chlorella protothecoides feststellte. Eine ebenfalls irreversible Reduktion des längerwelligen Chlorophyll fand BROWN (1969) nach kurzzeitigem Erhitzen von Chlorellapartikeln. Dabei trat dann eine Verschiebung der originalen Maxima um 6-8 nm in Richtung kürzerer Wellenlänge auf. Gleiche Befunde zeigten MEISTER und MASLOVA (1969) an Taraxacum-Blättern. Eine Veränderung der Relation Schulter 671 nm zu Maximum 678 nm wurde von MICHEL-WOLWERTZ (1969) an fragmentierten Euglena-Chloroplasten gefunden. Dazu wurden die Fragmente mit Protease behandelt, was eine Reduktion des Chlorophyll a 695 nm Gehaltes und ein Anwachsen des bei 673 nm absorbierenden Pigments zur Folge hatte. Wurde die Protease-Behandlung auf lange Zeit (3-4 Std.) ausgedehnt, zeigten sich starke Schäden, wobei Chlorophyll a 680 nm und 670 nm zerstört wurden. Das Chlorophyll a 680 nm war dabei wesentlich empfindlicher. Deutlicher konnten Veränderungen an Chlorella-Fragmenten erkannt werden, bei denen eine Protease-Behandlung von einer Stunde Dauer zur Reduzierung des Maximums bei 678 nm und zum Übergang der 670 nm Schulter zu einem Maximum führte.

Die bei unseren Bedingungen auftretende Verschiebung der Maxima zur kurzwelligeren Seite des Spektrums deutet auf eine

starke Schädigung der Algen hin. Wahrscheinlich treten zusätzlich zu den Chlorophyllhauptformen (FRENCH 1971a) noch Abbauprodukte auf, die das Spektrum beeinflussen. Die Schädigung weist darauf hin, daß das PS II wegen der Reduktion des Chlorophyll b 650 nm und der der kurzwelligeren Formen des Chlorophyll a, vor allem des bei 678 nm absorbierenden (FRENCH et al. 1971b), stark betroffen sind. Über eine Beeinträchtigung des PS I kann nur spekulativ aus der Gesamtverschiebung des Spektrums zur kurzwelligeren Seite hin geschlossen werden. Denn es war hier nicht möglich, die langwelligen Formen des Chlorophyll a zu erfassen.

Die Algen, die zwei LDW bei 41° C verbracht haben, liegen als ungeteilte herangewachsene Riesenzellen vor. Ihr Chlorophyllgehalt liegt bei etwa 20 % des der Normalkultur, und sie sind deutlich gelb gefärbt. In der Abb. 14 sieht man, daß das Chlorophyll b Maximum genauso gut vorliegt wie in der Normal-

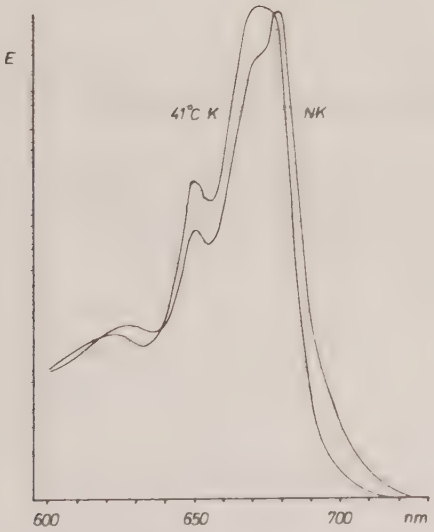

Abb. 14: Vergleich der Tieftemperaturspektren einer Normalkultur mit einer Kultur, die 2 x LDW in 41° C verbrachte.

kultur. Dann folgt eine breite Kurve mit einem schwachen Gipfel bei 672 nm und einer kaum ausgeprägten Schulter bei 678 nm. Die Schädigung ist sicher nicht so stark wie im zuerst geschilderten Fall, denn das proteingebundene Chlorophyll a 678 nm ist nicht so stark beeinträchtigt. Der angegebene Wert als Mittelwert aus neun verschiedenen Versuchen erlaubt es nicht, hier eine deutliche qualitative Verschiebung anzunehmen. Ein weiteres Indiz für die schwächere Beeinträchtigung der Algen ist auch die klare Form des 650 nm Chlorophyll b Peaks, der hier nicht durch die Überlappung stärker gewordener Nachbarbanden modifiziert ist.

Um weiteren Aufschluß über die Beeinträchtigung durch Hitzebehandlung zu erhalten, müssen zuerst Schockwirkungen, auch von kürzeren Schocks, die evtl. nicht zu so totaler Beeinträchtigung führen, in ihrem Einfluß auf die Algenkultur geklärt werden. Danach soll durch Test der Photosysteme deren Schädigung, die nach den Tieftemperaturspektren zu erwarten ist, festgestellt werden.

II. Charakterisierung des Wachstums nach einem längeren Schock während des Licht-Dunkel-Wechsels ($\geq$ 20 min)

Bisher wurden die Spektren von Algen betrachtet, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Zyklus einem Schock von 20 min 45° C im Dunkeln ausgesetzt waren. Die Wirkung ist bei solchen Schocks größer, als wenn während der Behandlung belichtet wurde (JASTER 1970). Während des Schocks wurde die Kontrollkultur verdunkelt, was, gegen eine Extrakontrolle gemessen, allein keinen meßbaren Produktionsabfall bewirkt. Nach dem Schock wurden Kohlenhydrat, Protein und Chlorophyll als Wachstumsparameter einige Zeit verfolgt, um die Auswirkungen einer solchen Behandlung zu erfassen.

Wird der Schock zu Beginn des Zyklus gegeben, so sind, wie Abb. 15 erkennen läßt, die Synthesen aller verfolgten Parameter stark beeinträchtigt. Der Chlorophyllgehalt, der bei den auf rel. ZZ 100 eingestellten Kulturen ohnehin nicht sehr hoch ist, fällt im Verlauf der Kulturdauer ab. Entsprechend dieser

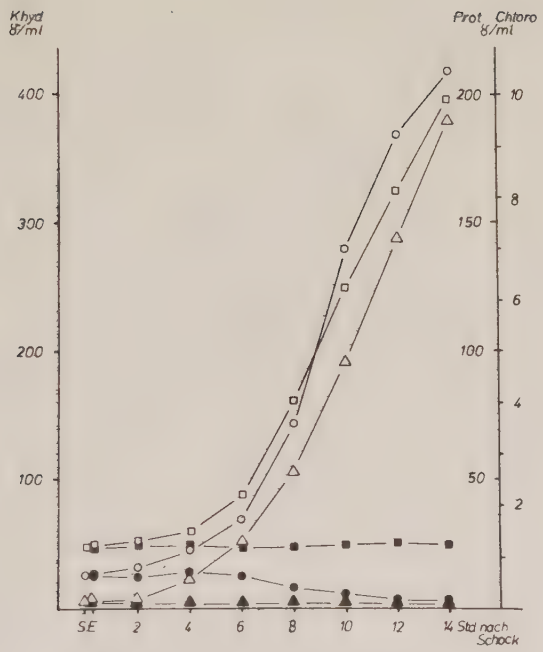

Abb. 15: Verlauf dreier Parameter einer Normalkultur und einer mit Beginn des LDW 20 min 45° C D geschockten Kultur. Dunkele Symbole gehören zur Schockkultur.
— o —,— ● — Chlorophyll — □ —,— ■ — Protein
— △ —,— ▲ — Kohlenhydrat

Entwicklung bleiben Kohlenhydrat- und Proteinspiegel fast unverändert und liegen somit in der 14. Std. unter den Ausgangswerten.

Werden die Algen nach der 1. Kulturstunde der Hitzebehandlung unterzogen, so ist der Verlauf der Wachstumsparameter im Prinzip gleich, allerdings erkennt man (Abb. 16) bis zur 14. Std. einen leichten Anstieg in der geschockten Kultur, der sich bis zum Ende des Zyklus fortsetzt, so daß diese Kultur nicht völlig ausbleicht. Allerdings ist der Zuwachs in diesem Fall ebenfalls so gering, daß eine starke Behinderung des normalen

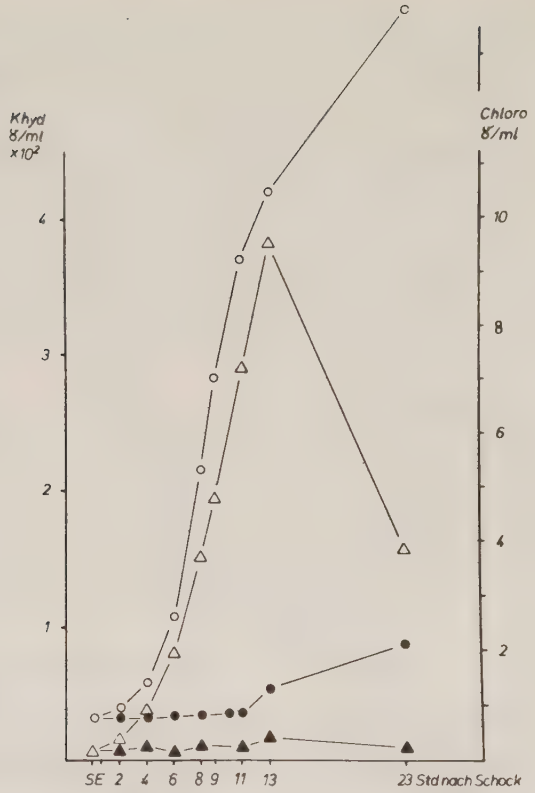

Abb. 16: Verlauf zweier Parameter einer Normalkultur und einer in der 1. Std. des Zyklus 20 min 45° C geschockten Kultur. Dunkle Symbole gehören zur Schockkultur
— o —, — ● — Chlorophyll — △ —, — ▲ — Kohlenhydrat

Wachstums deutlich wird. Diese Zellen teilen sich, wie das für alle mit diesem 20 min Schock behandelten Zellen gilt, innerhalb des 1. Zyklus nicht mehr. Läßt man sie danach für 24 Std. im Dunkeln und setzt die Kultur danach dem normalen LDW aus, produzieren diese Zellen genau so viele Autosporen wie unbehandelte Zellen. Fällt die 24stündige Dunkelzeit weg, erfolgt also sofort ein weiterer LDW mit normaler Beleuchtungsstärke, teilen sich diese Zellen jedoch nicht, produzieren aber im folgenden Zyklus normale Zellzahl. Anscheinend sind 24 Std. Ruhe nach einem Zyklus, in dem die Algen hitzebehandelt

wurden, notwendig, um ihre Produktionsfähigkeit voll zu regenerieren. Erstaunlich ist, daß es dabei gleichgültig ist, ob dabei Licht oder Dunkel herrscht. Denn es konnte gezeigt werden, daß Licht nach dem Schock zu den oben beschriebenen Schädigungen führt, Dunkelheit die Schockwirkung herabsetzt (LORENZEN 1963). Es soll noch festgestellt werden, daß die nach der ersten Stunde des Zyklus geschockten Algen nicht ganz so geschädigt waren wie die zu Beginn des Zyklus.

Werden nach der 6. Std. des LDW 20 min 45° C im Dunkeln gegeben (Abb. 17), wirkt sich das in ähnlicher Weise wie oben beschrieben aus. Vor allem der Chlorophyllgehalt ist betroffen und fällt innerhalb von 8 Std. nach dem Schock auf praktisch Null ab. Kohlenhydratspiegel und Proteingehalt stagnieren bzw. fallen ab und weisen damit auf tiefgreifende Schäden in den Algen hin. Denn hier in der empfindlichsten Phase (6. Std.) liegen Zellen vor, deren Produktionsapparat voll entwickelt ist. Der Schock verhindert nicht nur den weiteren Aufbau des Produktionsapparates der Zellen, sondern bereits funktionierende Systeme sind noch stärker betroffen.

Ein weiterer Hinweis auf die Schwere der Schädigung ergibt sich, wenn man diese ausgeblichenen Kulturen weiterzieht. Es ist nicht möglich, schon nach zwei weiteren Zyklen synchron hohe Produktion an Autosporen zu erreichen. Einige Zellen ergrünen wieder und sind nach mehreren Zyklen auch teilungsfähig, aber das sind ganz offensichtlich Zellen, die aus irgendeinem Grund nicht sehr stark geschädigt waren. Die Masse der Zellen (über 95 %) sind am Ende des ersten Zyklus abgestorben. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den von LORENZEN (1963) beschriebenen Beobachtungen.

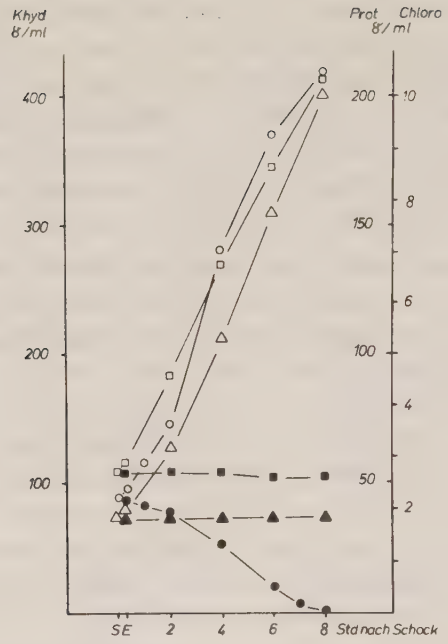

Abb. 17: Verlauf dreier Parameter einer Normalkultur und einer in der 6. Std. des Zyklus, der empfindlichsten Phase, 20 min 45° C D geschockten Kultur. Dunkele Symbole gehören zur Schockkultur.
—○—,—●—Chlorophyll —□—,—■—Protein
—△—,—▲—Kohlenhydrat

III. Auswirkung kürzerer Hitzeschocks (< 20 min)

Wie die beschriebenen Wirkungen erkennen lassen, ist ein Schock von 20 min Dauer in der empfindlichsten Phase, die zu charakterisieren interessant ist, ungeeignet. Denn es liegen so schwere Schädigungen vor, daß es unmöglich ist, etwas über unterschiedliche Reaktion der physiologischen Prozesse nach dem Schock auszusagen. Deshalb ist es notwendig, eine Verkürzung des Schocks zu erreichen. Um eine Vororientierung über das Verhalten der Kulturen zu erhalten, wurden in der 6. Std. des

LDW Schocks zwischen 1 min und 15 min gegeben und die Produktion dieser Kulturen am Ende des LDW gemessen. Wie man aus

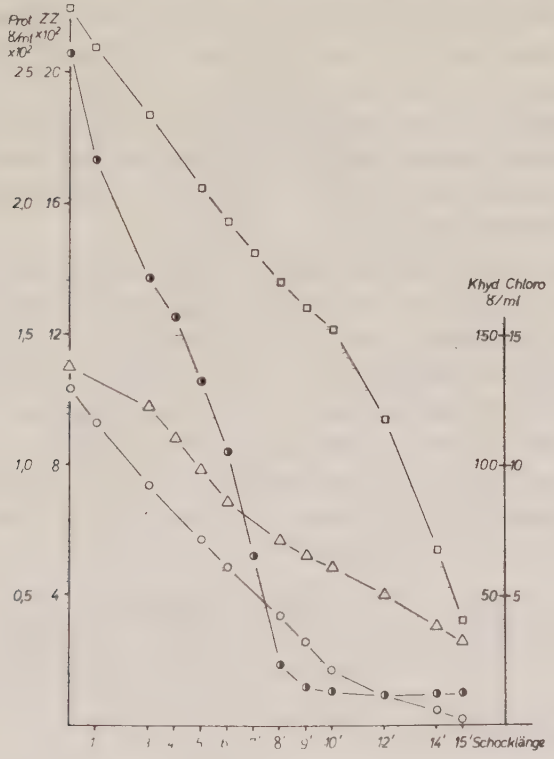

Abb. 18: Produktion am Ende eines LDW, in dessen 6. Std. 45° C D Schocks verschiedener Länge gegeben wurden.

—— ○ —— Chlorophyll —— □ —— Protein

—— △ —— Kohlenhydrat —— ◑ —— Zellzahl

Abb. 18 erkennt, fällt der Proteingehalt bis zur Schocklänge von 10 min kontinuierlich ab. Danach wird der Abfall stärker und erreicht beim 15 min Schock am Ende des Zyklus nur noch 15 % der Kontrolle. Betrachtet man den Chlorophyllgehalt, so findet man einen dauernden Abfall mit wachsender Schocklänge, und es werden nur noch 1,5 % des Gehaltes der Kontrolle beim 15 min Schock erreicht. Wie Abb. 18 zeigt, sinkt die Produktion an Tochterzellen ebenfalls mit wachsender Schocklänge rasch ab.

Schon bei einer Einwirkungszeit der hohen Temperatur von 10 min sind keine Teilungen innerhalb von 24 Std. mehr möglich. Die Kulturen zeigen von einem Schock von 6 min an eine verzögerte Freisetzung, die am Ende des Zyklus zu einer asynchronen Kultur führt. Auch der Kohlenhydratgehalt der Algen fällt mit längerer Einwirkungszeit ab, und beim 15 min Schock werden nur noch ca. 20 % des Kontrollwertes erreicht. Aus der Betrachtung dieser Wachstumsparameter und im Vergleich mit den oben angeführten Ergebnissen ist deutlich zu erkennen, welch extreme Folgen ein 20 min Schock hat.

Es soll noch bemerkt werden, daß bei kürzeren Schocks die Aufheizzeit bis auf 45° C einen relativ größeren Anteil an der Schockzeit erlangt. Durch eine Vorrichtung, die es erlaubt, alle Kulturen gleichzeitig und gleichlange in einem Aufheizbad von 70° C wenige Sekunden zu behandeln, war es möglich, diese Zeit wesentlich zu verkürzen. Die Kulturen waren während des Aufheizens selbstverständlich begast, um eine unterschiedliche Behandlung der Zellen in einer Kulturröhre (mögliche Randzellen) zu verhindern.

Die folgenden Untersuchungen wurden zum überwiegenden Teil an kurzen Schocks zwischen 1 min und 10 min Dauer vorgenommen. Zuerst wurden die schon genannten Parameter nach dem Schock verfolgt, um Aufschluß über die Reihenfolge und das Ausmaß der Schädigung zu erlangen.

Abb. 19 zeigt einen gleichen Verlauf für den K o h l e n h y d r a t g e h a l t in allen hitzebehandelten Kulturen, nur werden in der 14. Std. unterschiedliche Maxima erreicht. Bei der 10 min geschockten Kultur zeigt sich bis zur 4. Std. nach dem Schock eine starke Beeinträchtigung der Produktion, und der höhere Zuwachs in der restlichen Lichtzeit führt lediglich zu einem Gehalt von 40 % der Kontrolle. Die anderen Kulturen sind zwar auch beeinträchtigt, doch ist die Schädigung bei weitem nicht so ausgeprägt. Im Anstieg direkt nach dem Schock zeigt sich keine starke Verzögerung der Produktion.

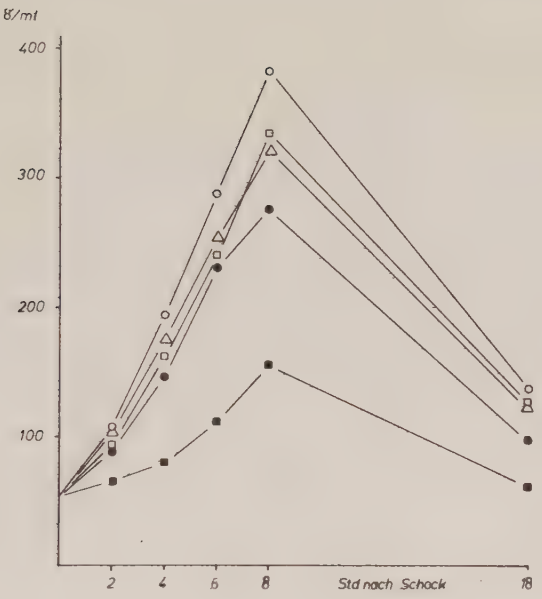

Abb. 19: Verlauf des Kohlenhydratgehaltes von Kulturen, die in der 6. Std. des LDW 45° C D Schocks unterschiedlicher Länge ausgesetzt waren.

—— o —— Kontrolle —— ● —— 5' Schock
—— □ —— 1' Schock —— ■ ——10' "
—— △ —— 3' Schock

Ein anderes Verhalten läßt der C h l o r o p h y l l - g e h a l t nach der Hitzebehandlung erkennen (Abb. 20). Schon ein Schock von 3 min Dauer läßt die Nettosynthese eine Stunde stagnieren, ehe der Gehalt in einem der Kontrolle ähnlichen Verlauf erneut ansteigt. Die Verlängerung des Schocks auf 5 min zeigt ebenfalls eine Stagnation von einer Stunde und danach eine zusätzliche Verzögerung der Produktion in den weiteren drei Stunden nach dem Schock; erst nach dieser Phase setzt eine normale Synthese ein. Dieser Befund unterstreicht das von ONWUEME and LAWANSON (1973) berichtete Ergebnis. Sie setzten etiolierte Colocynthis-Keimlinge verschiedenen Hitzeschocks aus und beobachteten eine Verlängerung der lag-phase einsetzender Chloro-

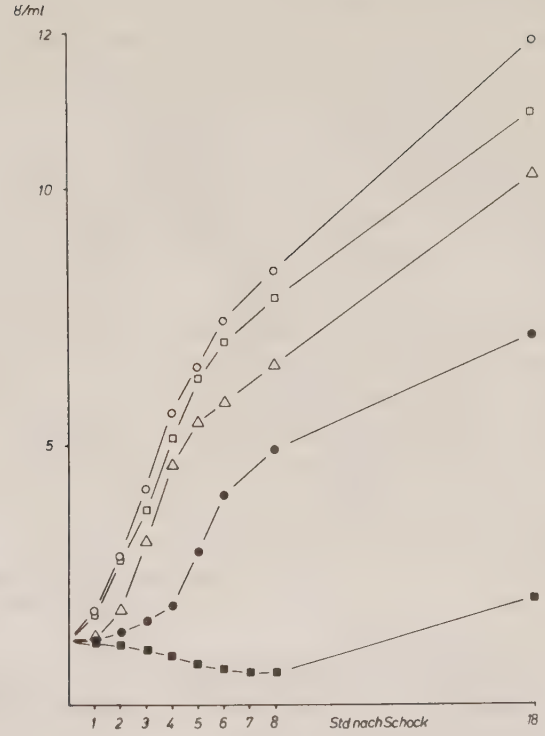

Abb. 20: Verlauf des Chlorophyllgehaltes von Kulturen, die in der 6. Std. des Zyklus 45° C D Schocks unterschiedlicher Länge ausgesetzt waren.

—— ○ —— Kontrolle —— ● —— 5' Schock
—— □ —— 1' Schock —— ■ —— 10' Schock
—— △ —— 3' Schock

phyllproduktion im Licht. Auch diese Pflanzen erreichten bis zum Ende des Versuches den Kontrollwert nicht.

Wie nach der langen Dauer eines 10 min-Schocks zu erwarten ist, erfolgt eine weitaus größere Schädigung. Die Kulturen verlieren vom Ende des Schocks an kontinuierlich Chlorophyll und haben in der 14. Std. des Zyklus, acht Stunden nach dem Schock, nur noch 50 % des Ausgangswertes. In der folgenden Dunkelzeit

sind diese Kulturen zu einer geringen Synthese fähig, die zu einem Endgehalt von ca. 16 % der Kontrolle führt.

Die halblogarithmische Darstellung der Chlorophyllproduktion bis zum Ende der Lichtzeit ergibt folgendes Bild (Abb. 21). Der Einminutenschock setzt die Produktion unwesentlich herab, die Geschwindigkeit der Zunahme und das Wachstum bis zur 10. Stunde des LDW entsprechen genau dem Verlauf der Kontrolle. Beim 3 min-Schock ist die log-Phase um eine Stunde verkürzt, das Ende dieser Phase stimmt mit dem der Kontrolle überein. Bei der Verlängerung des Schocks auf fünf Minuten erfolgt eine Aufteilung der log-Phase in drei Teile: erst eine Stunde Stagnation, dann ein verzögertes Wachstum, gefolgt von einer schnelleren log-Phase. Das Ende der letzten liegt um zwei Stunden später als in der Kontrolle. Beim 10 min-Schock ist die Abnahme im Chlorophyllgehalt in der Zeit von der 3.-6. Std. nach dem Schock besonders stark. Hier mag der Einfluß des Lichtes eine zusätzliche negative Rolle spielen. Diese starken Verschiebungen in der log-Phase, die selbst ein Zeichen für die optimale Produktion und damit auch Synchronisation (PIRSON und RUPPEL 1962) ist, zeigt die tiefgreifenden Einflüsse auch dieser kurzen Schocks.

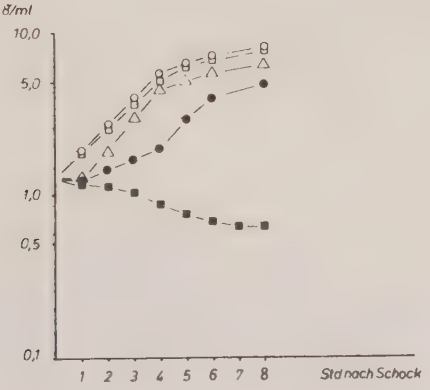

Abb. 21: Verlauf des Chlorophyllgehaltes von Kulturen, die in der 6. Std. des Zyklus 45° C D Schocks unterschiedlicher Länge ausgesetzt waren, in halblogarithmischer Darstellung.

—— o —— Kontrolle —— ● —— 5' Schock
—— □ —— 1' Schock —— ■ —— 10' Schock
—— △ —— 3' Schock

Wie man aus der Darstellung des Verlaufes der P r o t e i n p r o d u k t i o n ersieht, gilt das für den Kohlenhydratgehalt Gesagte weitgehend auch (Abb. 22). Die Unterschiede zwischen den hitzebehandelten Kulturen sind gering. Die beim Chlorophyllgehalt deutliche Stagnation nach dem Schock für die 3, 5 und 10 min-Behandlung zeigt sich als verzögerte Zunahme. Die 10 min-Schockkultur weist auch hier die weitaus größte Schädigung auf.

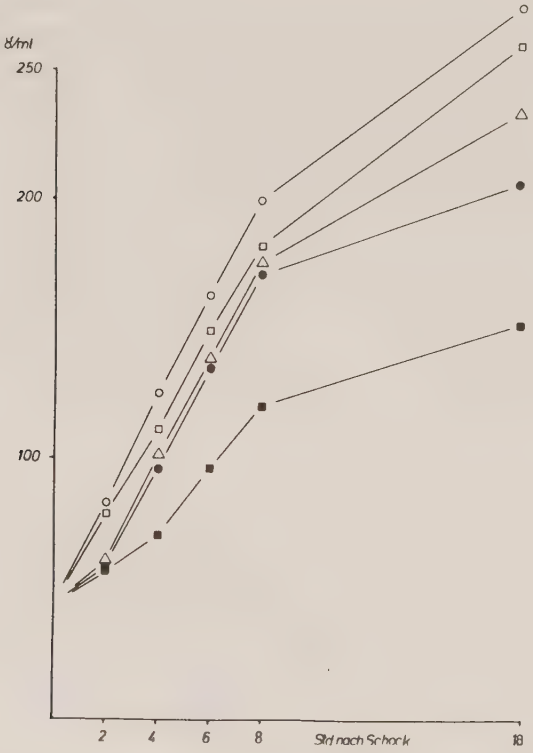

Abb. 22: Verlauf des Proteingehaltes von Kulturen, die in der 6. Std. des Zyklus 45° C D Schocks verschiedener Länge ausgesetzt waren.

—— O —— Kontrolle —— ● —— 5' Schock
—— □ —— 1' Schock —— ■ ——10' Schock
—— △ —— 3' Schock

In der Darstellung des V e r h ä l t n i s s e s von Kohlenhydrat- zu Proteingehalt (Abb. 23) zeigt sich eine Verschiebung dieses Quotienten gegenüber der Kontrolle erst von einem Schock von drei min ab. Bis zur 12. Std. des LDW ist das Verhältnis zu Gunsten des Kohlenhydrates verschoben, was auf eine vorübergehende Förderung der Dunkelreaktionen der CO_2-Fixierung hindeutet. Erst gegen Ende der Lichtzeit stellt sich annähernd der Wert der Kontrolle ein. Das gilt für die 5 min geschockte Kultur ebenso, nur ist die Verschiebung deutlich geringer. Am Wert der 14. Std. des Zyklus zeigt sich, daß auch

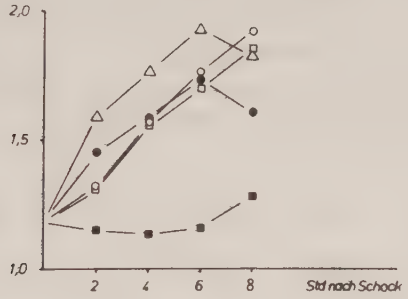

Abb. 23: Verlauf des Kohlenhydrat/Protein-Verhältnisses von Kulturen, die in der 6. Std. des Zyklus 45° C D Schocks verschiedener Länge ausgesetzt waren.

—— o —— Kontrolle —— ● —— 5' Schock
—— □ —— 1' Schock —— ■ ——10' Schock
—— △ —— 3' Schock

hier das Verhältnis zueinander deutlich gestört ist, was auf einer durch den Chlorophyllverlust beeinträchtigten Photosynthese beruht. Die Kurve für die 10 min geschockte Kultur fällt leicht ab, der Quotient verändert sich bis zur 12. Std. unwesentlich. Beide Parameter sind gleichermaßen vom Schock betroffen. Eine Erholung zeigt sich in den letzten beiden Std. der Lichtzeit, in der der Quotient etwas zu Gunsten des Kohlenhydrat verschoben wird.

Vergleicht man die Veränderungen dieser drei Wachstumsparameter, so zeigt sich, daß die Beeinflussung der Chlorophyllproduktion am größten ist. Der Verlauf des Kohlenhydratgehaltes wird am wenigsten verändert. Die Reihenfolge der Schädigung dieser drei Parameter ergibt sich daraus. Überraschend ist, daß trotz des starken Chlorophyllverlustes in der 10 min hitzebehandelten Kultur eine Zunahme an Kohlenhydrat und Protein zu verzeichnen ist.

Die bisher aufgezeigten Schädigungen müssen sich auch auf den Gasstoffwechsel der Kulturen auswirken. Um jedoch Messungen der O_2-Produktion vergleichend zwischen Schockkulturen und Normalkulturen durchführen zu können, war es nötig zu untersuchen, ob die Kulturen nach dem Schock eine andere Sättigungsenergie bei der Belichtung benötigen als die Kontrollen. Dazu wurde die Lichtenergie durch Filter stufenweise verändert und mit der schon beschriebenen Meßapparatur gearbeitet. Als Schock-

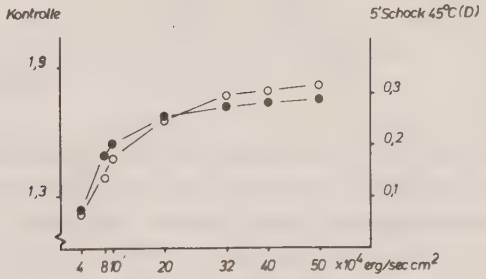

Abb. 24: Abhängigkeit der O_2-Produktion zur Zeit des Schockendes einer Normalkultur und einer in der 6. Std. des Zyklus 5' 45° C D geschockten Kultur von der Lichtenergie
—o— Kontrolle —●— 5' Schock

zeit wurde die mittlere Länge von 5 min gewählt, bei der evtl. vorhandene Verschiebungen schon deutlich würden. Um keine Erholung nach dem Schock verfälschend in die Messung eingehen zu lassen, wurden die Messungen stets mit frisch geschockten Algen durchgeführt. Wie die Darstellung (Abb. 24) zeigt, ergeben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Lichtsättigung für die

O_2-Produktion. Bei hitzebehandelten und unbehandelten Kulturen beginnt der Lichtsättigungsbereich bei 320 • 10^3 erg/sec cm^2. Da die nachfolgenden Messungen über den Verlauf der O_2-Produktion bei 400 • 10^3 erg/sec cm^2 durchgeführt wurden, ist ein Arbeiten im Sättigungsbereich stets gewährleistet.

Verfolgt man nun die S a u e r s t o f f p r o d u k t i o n (Abb. 25), so sieht man, daß alle Kulturen nach dem Schock weiter Sauerstoff produzieren. Die 1 min geschockte Kultur zeigt fast keinen Unterschied zur Kontrolle. Die 3 min behandelte Kultur läßt nach einer angedeuteten Verzögerung in der ersten Stunde einen steilen Anstieg erkennen, erreicht jedoch den ganzen Zyklus über niederere Werte als die Kontrolle. Für die

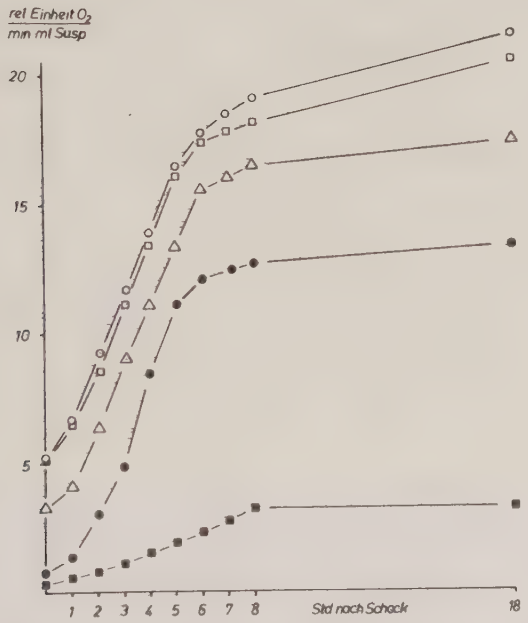

Abb. 25: O_2-Produktion von Kulturen, die in der 6. Std. des Zyklus 45° C D Schocks verschiedener Länge ausgesetzt waren.

—○— Kontrolle —●— 5' Schock
—□— 1' Schock —■— 10' Schock
—△— 3' Schock

5 min der Hitze ausgesetzte Kultur ist die Verzögerung in der Produktion in der ersten Stunde nach dem Schock deutlich zu erkennen, der weitere Verlauf entspricht dem der 3 min Kultur, wobei allerdings geringere Werte erreicht werden. Auch die 10 min behandelte Kultur weist noch eine O_2-Produktion auf, die jedoch einen fast linearen Verlauf im Gegensatz zum sigmoiden der anderen Kurven hat. Die Produktion ist im Zusammenhang mit dem Chlorophyllverlust stark reduziert.

Bildet man den Quotienten aus der O_2-Produktion und dem Chlorophyllgehalt, beides vom Hitzeschock beeinflußte Größen, so ergibt sich in der Darstellung Quotient gegen Kulturalter folgende Aussage (Abb. 26): Für die Normalkultur und die 1 min

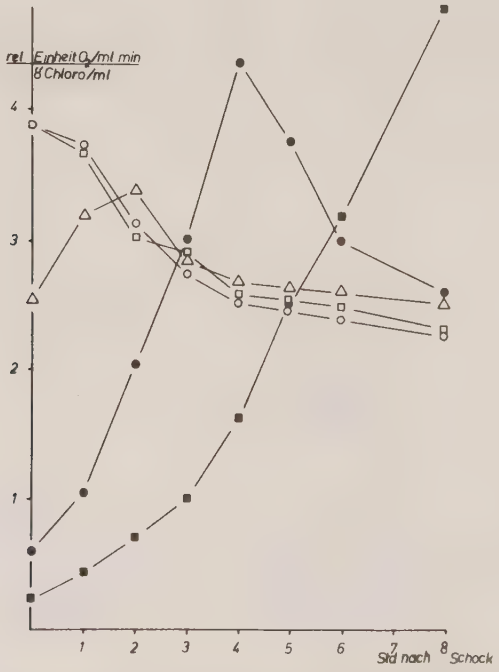

Abb. 26: Verlauf der auf den Chlorophyllgehalt bezogenen O_2-Produktion von Kulturen, die in der 6. Std. des LDW 45° C D Schocks verschiedener Länge ausgesetzt waren.

—— ○ —— Kontrolle —— ● —— 5' Schock
—— □ —— 1' Schock —— ■ —— 10' Schock
—— △ —— 3' Schock

behandelte Kultur zeigt sich für diesen Teil des Zyklus, daß der Chlorophyllgehalt schneller ansteigt als die O_2-Produktion, was auf der Bildung von accessorischen Pigmenten beruhen kann. Diese haben vor allem Kollektorfunktion und sind nicht direkt an den Zentren der Photosynthese beteiligt.

Die Kurve für die 3 min geschockte Kultur zeigt in ihrem Verlauf bis zur 2. Std. nach dem Schock an, daß die Chlorophyllbildung stärker als die O_2-Produktion beeinträchtigt ist. Im weiteren Verlauf gleicht sie sich den oben besprochenen Kurven an. Diese Aussage gilt bis zur 4. Std. nach dem Schock auch für die 5 min hitzebehandelte Kultur, für die 10 min geschockte Kultur bis zum Ende der Lichtzeit. Das Abknicken der Kurven bei den 3 und 5 min geschockten Kulturen zeigt den Beginn der Erholung an. Denn von diesem Augenblick an stellt sich das Verhältnis zwischen den Parametern ungefähr auf das in der Normalkultur ein.

Aus den Abb. 25 und 26 läßt sich für den Zeitpunkt Schockende erkennen, daß die O_2-Produktion stark beeinträchtigt ist:

	K	1'	3'	5'	10'
O_2-Prod.	100	100	50	17	6

Tab.8 O_2-Prod. verschieden lange geschockter Kulturen in Prozent der Kontrolle. Unmittelbar nach dem Schock gemessen.

Wird der Quotient O_2-Produktion/Chlorophyllgehalt gebildet, ergibt sich das gleiche Bild, denn zu diesem Zeitpunkt ist noch keine Veränderung dieser Bezugsgröße festzustellen. Es ist so, daß die Sauerstoffproduktion durch die Hitzeschocks wesentlich stärker beeinträchtigt wird und die Schädigung auch schneller als die des Chlorophyllgehaltes erfolgt.

Auch dieser Befund deutet, ebenso wie die Feststellungen aus der Betrachtung der Tieftemperaturspektren auf eine Beeinträchtigung der Photosysteme durch die Hitzebehandlung hin. Es galt nun diesen Einfluß zu ermitteln und evtl. eine unterschiedliche Schädigung der beiden Photosysteme festzustellen.

IV. Tests der Photosysteme in vitro aus verschieden lang geschockten Algen

a) Messungen direkt am Ende des Schocks

Wie die Sauerstoffproduktion zu diesem Zeitpunkt erkennen ließ, scheinen die Beeinflussungen der Photosysteme sehr schnell zu geschehen. Die Algen wurden geerntet und in Anlehnung an KOK (1965) und CHENIAE and MARTIN (1973), wie im Methodenteil beschrieben, präpariert. Dieser Schritt war notwendig, da in intakten Algen möglicherweise Störreaktionen ablaufen, und es auch nicht sicher ist, ob alle zuzusetzenden Substanzen in die Zellen gelangen. Neben der verwendeten Methode bot sich die Durchführung der Tests mit durch Formol abgetöteten Algen an (LUNDLOS and PARK 1969). Dabei kann die Wirkung des Giftes nicht kontrolliert werden; eine Vergiftung der Transportmechanismen an den Membranen bedingt noch nicht ein gleichmäßiges Diffundieren der zugesetzten Testsubstanzen.

Die Durchführung der Tests wurde in Anlehnung an HARNISCHFEGER (1970) und POSTIUS (1972) orientiert. Dabei war beim PS I Test auf strenges anaerobes Arbeiten zu achten. Denn wie auch VERNON und HOBBES (1957), VERNON (1961) und VERNON et al. (1966) zeigten, wird Methylrot in Gegenwart von O_2 schnell reoxidiert. Durch Evakuierung und anschließende N_2-Begasung ähnlich wie bei ASH (1961) und dem beschriebenen Testansatz konnte diese Bedingung eingehalten werden. Weiter wurde untersucht, ob durch die Art der Präparation Aktivitätsverluste entstanden, und ob Nebenreaktionen in den Testansätzen abliefen, die nichts mit den Photosystemen zu tun hatten. Dazu wurde dem Testansatz für PS II DCMU hinzugefügt und stets für beide Photosystemtests eine Dunkelkontrolle gestartet. Mit dem Pellet der ersten Zentrifugation und dem Überstand der zweiten wurde ebenso verfahren. Das Ergebnis zeigt Tab. 9. Deutlich ist zu erkennen, daß stets im Pellet 2 die größte Aktivität vorliegt. Besonders gut ist die Präparation in Bezug auf das PS I, bei der fast keine Verluste der Aktivität durch die verworfenen Fraktionen auftreten. Bei PS II ist das ebenfalls wenig, und die Relation von Fremdaktivitäten zur Gesamtaktivität ist im Pellet 2 weitaus am günstigsten. Der Überstand 2 zeigt fast keine Aktivität.

		PS II	PS I
Pellet (1)	Dunkel	7,9	1,2
	+ DCMU	10,4	---
	Normal	48,5	28,8
Pellet (2)	Dunkel	16,2	4,7
	+ DCMU	20,2	---
	Normal	138,5	189,6
Überstand (2)	Dunkel	8,8	---
	+ DCMU	11,2	---
	Normal	12,6	2,6

Tab. 9 Die auf Chlorophyll bezogenen Aktivitäten von PS I und PS II in den bei der Präparation anfallenden Fraktionen (siehe Text).

Wie die Kurven der Abb. 27 erkennen lassen, haben schon die sehr kurzen Temperaturschocks von 1-5 min Dauer einen großen Einfluß auf die Photosysteme. Dabei gilt für alle geprüften Schocklängen, daß das PS II stärker als das PS I beeinträchtigt ist. Besonders deutlich wird das in der prozentualen Darstellung. Beim 1 min-Schock ist der Unterschied noch gering, aber bereits beim 3 min-Schock ist das PS II um 20 % mehr beeinträchtigt. Das konnten auch HINKSON and VERNON (1959) zeigen, als sie Chloroplasten auf 51° C erhitzten und vor allem beim PS II, mit DCPIP als Elektronenacceptor gemessen, die Schädigung feststellten. Dabei scheint, wie auch KATOH and SAN PIETRO (1967) sowie STUART and GAFFRON (1972) annehmen, der Angriffspunkt des Hitzeschocks im Mechanismus der Photolyse des Wassers zu liegen. Weiter konnte STUART (1971) zeigen, daß durch ein Erhitzen von Chloroplastenbruchstücken für 1-2 min auf 55° C die Hillreaktion mit p-benzoquinon, die Photoreduktion und die cyklische Photophosphorylierung streng unterbunden werden. Die Aktivität des PS I, ebenfalls wie hier mit Methylrotreduktion gemessen, sank bei 2 min 55° C Einwirkung auf 55 % des Ausgangswertes. An Chromatophoren aus Rhodospirillum rubrum konnte PFISTERER (1970) zeigen, daß durch 5 min Einwirken von 60° C die O_2-Produktion völlig, und die bei Bakterien allein vorhandene

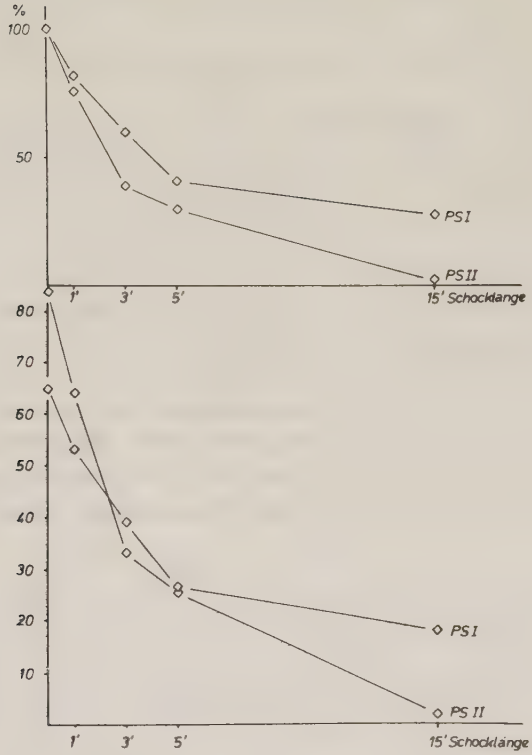

Abb. 27: Aktivität der beiden Photosysteme in Prozent der Kontrolle (oben) und als µMol Umsatz/mg Chloro (Std. (unten Gemessen wurde sofort nach dem 45° C D Schock unterschiedlicher Länge in der 6. Std. des Zyklus.

cyclische Photophosphorylierung zwischen 50 % und 100 % gehemmt war. Beim Arbeiten mit isolierten Chloroplasten fanden MUKOHATA et al. (1973a) schon bei 5 min 45° C Anwendung eine starke Beeinträchtigung der Photosysteme. Durch Fluoreszenzmessungen wiesen sie vor allem eine Schädigung des PS II nach. Weiter zeigten sie den schädigenden Einfluß des Hitzeschocks auf die O_2-Entwicklung, den e^- Transport und die Photophosphorylierung. Bei Anwesenheit langkettiger aliphatischer Alkohole während des Schocks wurde dessen Einfluß gemildert (MUKOHATA et al. 1973b).

Auch soll sich die Struktur der Thylakoide in den isolierten Chloroplasten deformieren.

Auch bei dem hier untersuchten Objekt war die Empfindlichkeit des photosynthetischen Apparates sehr groß. Schon ein Schock von 5 min Dauer (45° C D) verringerte die Aktivität der Systeme um mehr als 50 %. Bei einer Einwirkungsdauer von 15 min war fast keine Aktivität mehr festzustellen.

b) Messung der Aktivitäten am Ende des LDW

Ein anderes Bild erhält man bei der Messung der Systeme, wenn die Algen nach dem Schock in der 6. Std. des Zyklus den 14 : $\overline{10}$ LDW völlig durchlaufen haben (Abb. 28).

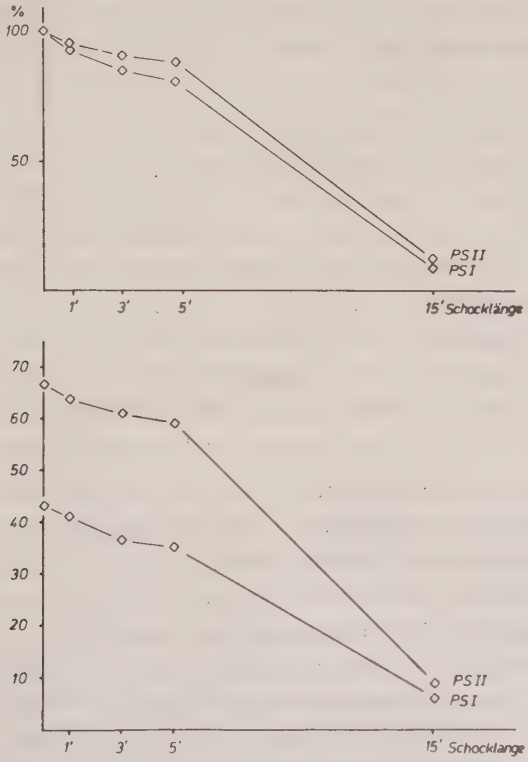

Abb. 28: Aktivität der beiden Photosysteme in Prozent der Kontrolle (oben) und als uMol Umsatz/mg Chloro Std. (unten). Gemessen wurde am Ende des LDW, in dessen 6.Std 45° C D Schocks unterschiedlicher Länge gegeben wurden.

Deutlich ist bei allen Kulturen eine Erholung zu verzeichnen. So ist es den Kulturen, die einem Schock bis zu 5 min ausgesetzt waren, möglich, die Aktivität der Photosysteme mindestens auf 80 % (PS I 5 min Schock) zu regenerieren.

Unter diesen Bedingungen resultiert kein Dauerschaden. Die Schwankungen der angegebenen Werte betragen bei einem mittleren Fehler von doppelter Standardabweichung ca. 6 %.

Bemerkenswert ist, daß in der prozentualen Betrachtung das PS II bei den kürzeren Schocks stets höhere Werte als das PS I erreicht. Die oftmals gefundene Sensibilität des PS II kommt hier nicht nur in der größeren Empfindlichkeit gegen einen Hitzeschock, sondern auch in der besseren Regeneration zum Ausdruck. Die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit der Photosysteme liegt möglicherweise in der verschiedenen Bindung der den Photosystemen zugeordneten Chlorophyllformen (lipidgebunden - proteingebunden).

Es soll noch festgestellt werden, daß die hier gemessene Aktivität der Reaktionen unter der liegt, die man üblicherweise beim Arbeiten mit isolierten Chloroplasten findet. (HARNISCH-FEGER 1970, POSTIUS 1972). Diese beiden Verfasser benutzten außerdem eine 10fach höhere Energie des Erregerlichtes, was einen höheren Umsatz bewirkt. Die vorliegenden Versuche wurden mit einer bestimmten Zellfraktion durchgeführt, in der sicher zusätzlich inaktive Chloroplastenbruchstücke enthalten sind. Diese besitzen Chlorophyll und beeinflussen so die Bezugsgröße, nicht jedoch den gemessenen Umsatz.

Der Befund, daß die auf Chlorophyll bezogenen Umsätze für die Normalkultur am Ende des Zyklus geringer sind als in der 6. Stunde, kann zwei Gründe haben. Entweder wird durch die Bildung von vorwiegend accessorischen Pigmenten, die hauptsächlich die Bezugsgröße beeinflussen, die spezifische Aktivität verringert. Das setzt voraus, daß in der 6. Stunde bereits ein ausreichendes Pigmentsystem vorliegt. Oder durch die lange Dunkelzeit sind die Systeme in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden die Aktivitäten über den gesamten Zyklus verfolgt.

Gleichzeitig soll die Sauerstoffproduktion während des LDW verfolgt werden. Indem die gleiche Bezugsgröße wie beim Test der Photosysteme gewählt wird, soll anschließend ein Vergleich der Sauerstoffproduktion mit den Photosystemaktivitäten versucht werden.

Im Anschluß an eine kurze lag-Phase steigt die O_2-Produktion (Abb. 29) nach der 4. Std. kontinuierlich an. Etwa zur 15. Std. erreicht sie ein Maximum und fällt dann stark bis zur 19. Std. ab. Danach steigt die Produktion wieder an und erreicht in der 24. Std. des Zyklus ihren höchsten Wert. Die zeitliche Lage des Minimums schwankte in mehreren Versuchen um $\pm$ 1 Std. um die 19. Std. des Zyklus. Ein Zusammenhang mit dem Beginn der Zellteilung, evtl. auch schon mit dem Beginn der Autosporenfreisetzung (SENGER und BISHOP 1969), die um die 21. Std. erfolgt, ist gegeben. Dieser Befund deckt sich mit denen, die SOROKIN (1957) am Hochtemperaturstamm von Chlorella fand. Vergleiche für Scenedesmus SENGER und BISHOP (1969).

Der Chlorophyllgehalt (Abb. 29) steigt nach einer Phase geringer Zunahme kontinuierlich an, in der Dunkelzeit weniger stark (RUPPEL 1962).

Bezieht man die Sauerstoffproduktion auf den Chlorophyllgehalt, so ergibt sich (Abb. 29) ein Anstieg, der in der 4. Std. des Zyklus zu einem Maximum führt. Dann erfolgt ein Abfall über ein Plateau in der 14. Std. bis zum Minimum in der 19. Std. des Zyklus. Nun steigt die Kurve sich abflachend bis zum Ende der Dunkelzeit an.

Die auf den Chlorophyllgehalt bezogenen Umsätze der Photosysteme sind für den gesamten Zyklus in Abb. 30 dargestellt. Beide Photosysteme verändern sich; sie steigen vom Beginn der Lichtzeit an und erreichen in der 6. Std. ein Maximum. Das stimmt gut mit der Lage des Empfindlichkeitsmaximums gegen Hitzeschocks überein. Danach fallen die Kurven bis zu einem Minimum in der 14. Std. ab; sie erreichen in der 18. Std. erneut ein Maximum. Bis zum Ende des Zyklus ist ein fallender Verlauf zu beobachten.

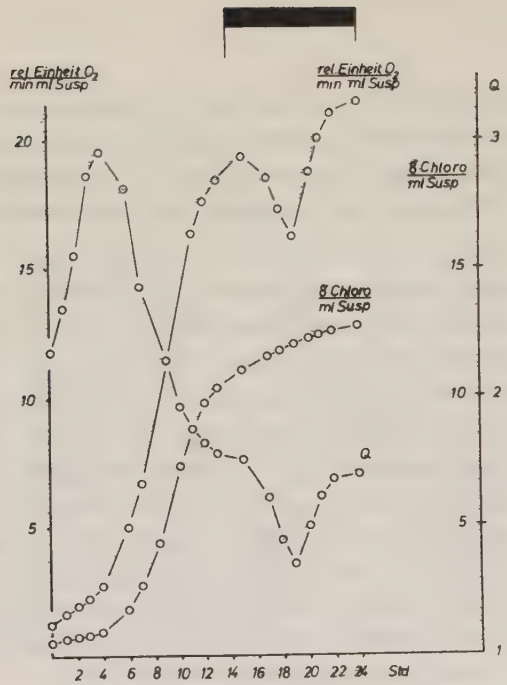

Abb. 29:
Chlorophyll- und O_2-Produktion sowie ihr Verhältnis in einer Normalkultur über den Zyklus

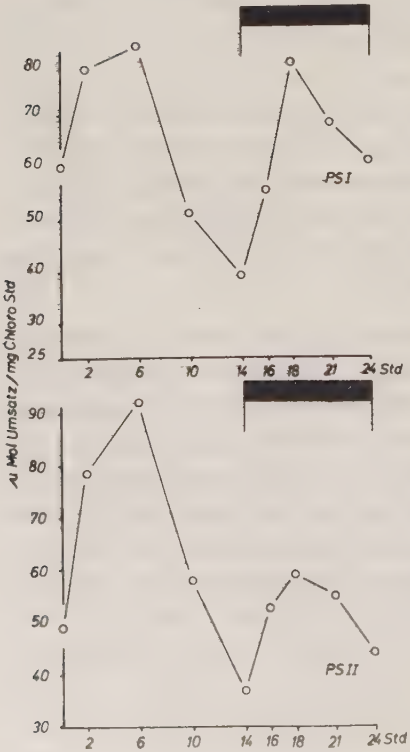

Abb. 30:
Aktivitäten (µMol Umsatz/mg Chloro Std.) von PS I (oben) und PS II (unten) über den Zyklus einer Normalkultur.

Der Vergleich mit der auf den Chlorophyllgehalt bezogenen O_2-Produktion (Abb. 29) weist für beide Photosysteme in der Lichtzeit einen gleichsinnigen Verlauf auf. Die Lage des Maximums des Quotienten O_2-Produktion/Chlorophyllgehalt stimmt nicht ganz überein, allerdings ist der Unterschied gering. Dieser Befund ähnelt dem von SENGER und BISHOP (1969) an synchronen Scenedesmus-Kulturen gemachten. Dort wurde über den gesamten Zyklus ein gleichsinniger Verlauf der PS II Aktivität, mit p-benzoquinon gemessen, gefunden. Für das PS I ergaben sich, in der 8. und 16. Std. des Zyklus gemessen, keine Unterschiede. Veränderungen in der Aktivität führen SENGER und BISHOP (1972) auf Wechsel in der totalen Carotinoidkonzentration oder eine Umorientierung dieser Moleküle zurück, die sie bei 480 nm in Tieftemperaturspektren beobachteten. Allerdings waren die Veränderungen gering, und der Befund erscheint nicht gesichert.

Vergleicht man nun in den vorliegenden Versuchen während der Dunkelzeit die Photosystemaktivitäten mit der O_2-Produktion bei gleicher Bezugsgröße (Abb. 29 und 30), so ergibt sich ein völlig anderes Bild. Die Kurven haben einen gegenläufigen Verlauf, wobei das Maximum in Abb. 30 zeitlich recht gut mit dem Minimum in Abb. 29 übereinstimmt. Einen ähnlichen Verlauf an Scenedesmus erhielt WERTHMÜLLER (1972, Abb. 5 und 7). Hier wurde an autotrophen Kulturen in der Dunkelzeit ein geringer Zuwachs der potentiellen O_2-Produktion gefunden, während die Hillreaktion mit p-Benzochinon im selben Zeitraum einen starken Anstieg aufweist. Dieses Verhalten ist bisher nicht zu deuten. Ein weiterer Hinweis auf mögliche Diskrepanzen im Verhalten von Hillreaktion und O_2-Produktion wurde bei WERTHMÜLLER und SENGER (1972) in der Untersuchung der Alterung von Algenkulturen gefunden. Bei Scenedesmus und Chlorella, den beiden untersuchten Objekten, fällt die O_2-Produktion innerhalb von 9 Tagen kontinuierlicher Kultur ständig ab, das gleiche gilt für die Hillreaktion. Für Chlorella dagegen wird nur bis zum 2. Tag ein Abfall beobachtet, dann jedoch ist der Verlauf der O_2-Produktion gegenläufig und erreicht sogar höhere Umsätze als zu Beginn. Die Verfasser haben für dieses Verhalten keine Erklärung und vermuten, daß dieser Befund für Chlorella charakteristisch ist. Diese Befunde wurden an intakten Algen gewonnen und beide nicht am optimalen System, wie es eine Synchronkultur darstellt.

Trotzdem scheint es so, als ob sich die hier betrachtete Beziehung möglicherweise von Organismus zu Organismus verschieden darstellen könnte. An Spinat-Chloroplasten wurde durch schädigende Einflüsse (Hitze, Alterung und Tris-Waschungen) die Sauerstoffproduktion unterbunden. Aber wie DÖRING und WITT (1972) sowie HAVEMANN und DONZE (1972) feststellten, waren die Reaktionszentren des PS II dabei nicht zerstört.

Auf Unterschiede im Verlauf der Aktivitäten der Photosysteme bei verschiedenen Arten deuten auch Befunde über das PS I hin. Fanden SENGER und BISHOP (1969) und SENGER (1970) keinen Unterschied in der Aktivität bei zwei verschiedenen Zellstadien von Scenedesmus, so zeigten sich bei Chlamydomonas deutliche Schwankungen während des Lebenszyklus (SCHOR et al. 1970).

V. Einfluß von Farblicht auf die Schockwirkung

Licht nach dem Schock gegeben verstärkt dessen Wirkung, wohingegen längere Dunkelheit vor allem den Verlust an Chlorophyll verhindert. Es lag deshalb nahe, die Algen nach dem Schock Farblicht auszusetzen, um zu prüfen, ob der Verlust an Chlorophyll im Licht eines bestimmten Wellenbereiches eintritt.

Dazu wurden die Algen nach dem Schock, der wie üblich appliziert wurde, für den Rest der Lichtzeit in den bei ANDERSAG (1972) beschriebenen Farblichtthermostaten gebracht. Am Ende des Zyklus wurde die Produktion von Protein, Kohlenhydrat und Chlorophyll gemessen und auf eine gleichbehandelte, ungeschockte Kontrolle bezogen. Die Farblichtbehandlung erfolgte bei drei verschiedenen Energien, deren höchste dem bei STEUP (1972) angegebenen Wert für die gleiche Trockengewichtsproduktion der Kulturen entsprach.

Wie aus der Tab. 10 zu entnehmen ist, verhalten sich die Veränderungen von Kohlenhydrat und Protein in den Kulturen gleich. Betrachtet man den auf die jeweilige Kontrolle bezogenen Chlorophyllgehalt (Abb. 31), so ist deutlich zu erkennen, daß Rotlicht nach dem Schock schädlicher ist als Blaulicht.

Das trifft für alle hier verwendeten Lichtenergien zu. Dieser Befund ist insofern überraschend, als bei Chlorella im Rotlicht die Chlorophyllsynthese gegenüber Blaulicht gesteigert wird (WILCEK 1971, STEUP 1972). Es scheint hier neben der Farblichtwirkung ein positiver Einfluß von Schwachlicht zu bestehen. Dafür spricht, daß bei der höchsten Intensität

		ROT				BLAU			
		1'	3'	5'	10'	1'	3'	5'	10'
E_1	Khydr.	95,8	91,5	91,0	66,5	95,0	90,3	88,2	64,5
	Prot.	100,0	94,0	83,0	77,7	100,0	91,0	72,6	75,0
	Chloro.	71,5	66,7	63,0	41,0	99,0	98,0	91,0	66,2
E_2	Khydr.	89,1	91,0	75,5	50,0	93,5	94,0	78,9	46,5
	Prot.	71,6	91,0	78,0	50,0	100,0	100,0	82,0	55,0
	Chloro.	86,6	82,0	66,5	34,7	100,0	99,0	93,5	63,0
E_3	Khydr.	90,7	78,7	60,0	51,0	87,0	78,0	68,2	57,0
	Prot.	80,0	77,8	60,7	48,0	100,0	100,0	71,0	66,0
	Chloro.	92,2	79,9	64,3	43,2	98,0	97,0	88,5	75,0

Tab. 10 Zusammensetzung von Algen, die nach verschieden langen Schocks (45°C D) für den Rest der Lichtzeit Farblicht unterschiedlicher Intensität ausgesetzt waren. Angaben in Prozent der ungeschockten Kontrolle.
E_1 = 3,5 10^4 (Rot), 2,0 10^4 (Blau) erg / sec cm^2
E_2 = 1,6 " ("), 1,7 " (") "
E_3 = 0,8 " ("), 1,0 " (") "

an Rotlicht (Abb. 31) nach kürzeren Schocks (1 und 3 min) ein deutlich stärkeres Ausbleichen als bei geringeren Intensitäten erfolgt.

Wird im Anschluß an den Schock für 6 Std. Farblicht verabreicht (nach 6 Std. Dunkel ist im anschließenden Weißlicht die Schockwirkung stark abgeschwächt), so zeigt sich, daß die Chlorophyllsynthese der Farblichtkulturen im folgenden Weißlicht deutlich schwächer ist als die der Dunkelkulturen. Dabei ergibt sich kein Unterschied der Syntheseraten von Rot und Blau. Da die Anzucht im Rotlicht den Chlorophyllgehalt gegenüber Blaulicht steigert, wurde nun der Einfluß von Farblichtvoranzucht

auf die Wirksamkeit der Hitzeschocks geprüft. Nach dem Schock wurden die Kulturen für den Rest der Lichtzeit in Weißlicht gebracht. Die Kulturen mit Rotlichtvoranzucht enthalten am Ende des Zyklus etwas mehr Chlorophyll, starteten jedoch auch nach dem Schock mit einem leicht höheren Gehalt. Es läßt sich somit kein eindeutiger Farblichteffekt auf die Schockwirkung feststellen. Nach dem Schock gegebenes Blaulicht hat möglicherweise einen Schutzeffekt zur Folge.

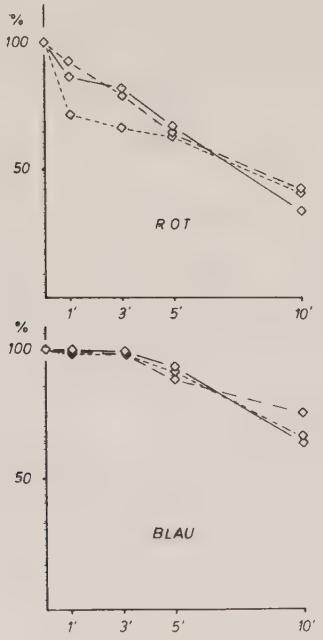

Abb. 31: Chlorophyllgehalt am Ende des LDW in Prozent der Kontrolle von verschieden lange bei 45° C D geschockten Algen. Rotlicht (oben) und Blaulicht (unten) drei verschiedener Energien wurde vom Ende der Schocks für den Rest der Lichtzeit eingestrahlt.

VI. Untersuchung des Gesamtlipidgehaltes

Die bisher geschilderten Wirkungen der Hitzeschocks vor allem auf den Chlorophyllgehalt, legten die Vermutung nahe, daß neben den Pigmenten auch Membransysteme, wahrscheinlich vor allem die des Chloroplasten geschädigt worden sind. Die Differenz zwischen Gesamtlipid und Chlorophyllgehalt am Ende des Zyklus sollte als Hinweis für eine solche Beeinflussung dienen. Wie das Diagramm zeigt, ist eine Beeinträchtigung dieses Lipidanteils gegeben,

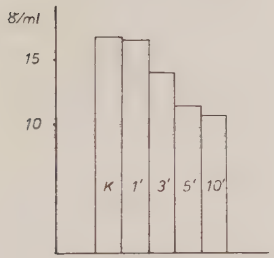

Abb. 32:
Gehalt an Lipiden (Gesamtlipid - Chlorophyll) in unterschiedlich lange geschockten Kulturen am Ende des LDW.

allerdings ist die Schädigung deutlich schwächer als die des Chlorophyllgehaltes. Schädigungen von Membranen durch Hitzebehandlung fanden BEN ZIONI und ITAI (1973) an Tabakblättern. Hier war der Temperaturbereich von 44° C - 49° C besonders schädigend, was auch in einer starken Hemmung der Phospholipidsynthese zum Ausdruck kam. JUNKNICKEL (1971) fand bei Anwendung von Temperaturen ab 48° C eine Abgabe zelleigenen Phosphates, was auf Strukturschäden an den von ihm untersuchten Hefezellen schließen läßt.

VII. Einfluß der Hitzeschocks auf den Phosphatstoffwechsel

1. Gesamtphosphatgehalt

Nach der bisherigen Charakterisierung der Einflüsse von kurzzeitigen Hitzebehandlungen sollte untersucht werden, ob auch die Aufnahme von Ionen beeinflußt wird. Die Untersuchung der Phosphataufnahme, die wie die von anderen Ionen auch, energie-

abhängig ist (u.a. WEIGL 1963), kann Hinweise auf die Beeinflussung des Transportes von Ionen durch die Membranen und auf die Energiesituation in der Zelle geben.

In halbstündigen Abständen wurden nach dem Schock Proben entnommen. Wie Abb. 33 zeigt, ist die Aufnahme von Phosphat in den geschockten Kulturen deutlich verringert. Dabei weist die

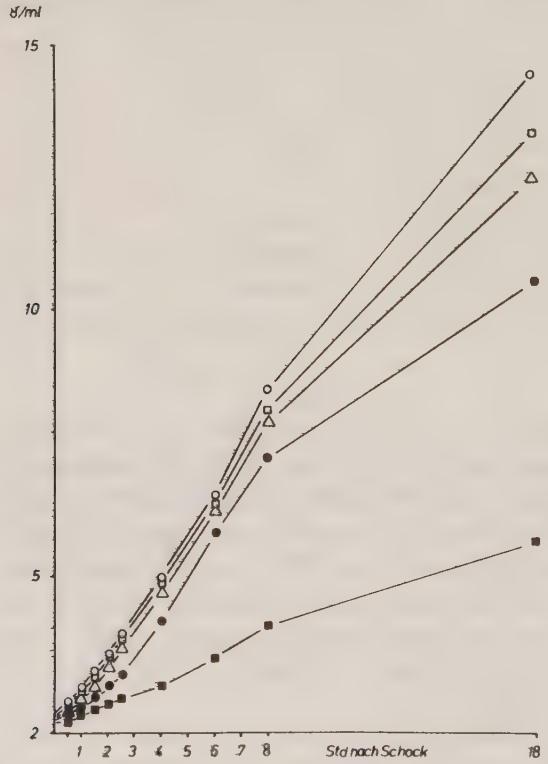

Abb. 33: Verlauf des Gesamtphosphatgehaltes von Kulturen, die in der 6. Std. des Zyklus 45° C D Schocks unterschiedlicher Länge ausgesetzt waren.

—— ○ —— Kontrolle —— ● —— 5' Schock
—— □ —— 1' Schock —— ■ —— 10' Schock
—— △ —— 3' Schock

1 min Schockkultur fast keinen Unterschied zur Kontrolle auf, der Kurvenverlauf ist ebenso geradlinig wie der der Kontrolle. Schon beim 3 min und verstärkt beim 5 min und 10 min Schock ist der Anstieg im Gesamtphosphat verringert. Die Kurven verlaufen nicht mehr linear, sondern weisen mit wachsender Schockdauer einen immer stärker verzögerten Anstieg auf. Man findet bei der 3 min und der 5 min Schockkultur von 2,5 Std. nach dem Schock an bis zum Ende des Zyklus ein starkes Ansteigen im Phosphatgehalt. Dabei erreicht die 3 min hitzebehandelte Kultur fast den Kontrollwert. Dagegen ist bei den 10 min geschockten Algen die Verzögerung auf 4 Std. ausgedehnt, und in der restlichen Lichtzeit erfolgt nur ein Anstieg auf 55 % des Kontrollwertes. Ähnliche Ergebnisse weisen die Untersuchungen von BENZIONI und ITAI (1973) an hitzebehandelten Tabakblättern auf. Sie fanden bei 44,7° C - 49,2° C einen stark reduzierten ^{32}P-Einbau, der sich dann besonders in einer rückläufigen Phospholipidkonzentration niederschlug.

In der anschließenden Dunkelzeit erfolgt in unserer Kultur nur eine geringe Aufnahme an Phosphat, was auf die Schädigung der Proteinsynthese (wie schon gezeigt) und der Nukleinsäuresynthese schließen läßt. Das gilt in solch krassem Maße für die anderen Kulturen nicht, vermag doch die 5 min Schockkultur ihren Gesamtphosphatgehalt in der Dunkelzeit um 60 % vom Gehalt am Ende der Lichtzeit zu steigern. Das ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß diese Algen noch beträchtliche Mengen an veratembarem Material (Abb. 19) in der Lichtzeit nach dem Schock synthetisieren können.

2. Untersuchung einzelner Phosphatfraktionen

Die deutlichen quantitativen Unterschiede im Gesamtphosphatgehalt am Ende des LDW legten die Vermutung nahe, daß die unterschiedlich starke Phosphataufnahme mit einer veränderten Aufteilung des Phosphats auf die verschiedenen Fraktionen bei der hitzebehandelten Kultur einhergeht. So wurde in Anlehnung an PIRSON und KUHL (1958) eine Fraktionierung vorgenommen, wobei ausgehend von der Algensuspension, wie im Methodenteil beschrieben, drei Fraktionen erfaßt wurden. Das waren: 1. Gesamtes

labiles Phosphat, 2. Gesamtes säureunlösliches Phosphat, 3. Säureunlösliches labiles Phosphat. Nach diesen Bestimmungen war es möglich, durch Subtraktionen noch weitere Fraktionen zu bestimmen.

Ges. unlösl. Phosphat - säureunlösl. lab. Phosphat
= säureunlösl. stab. Phosphat

Ges. lab. Phosphat - säureunlösl. lab. Phosphat
= säurelösl. lab. Phosphat

Das Ergebnis zeigt Tab. 11 und Diagramm 34. In allen Kulturen bildet das TCA unlösliche labile Phosphat die größte Fraktion und das TCA lösliche labile Phosphat die kleinste. Der Verlauf des Gesamtphosphates am Ende des Zyklus in Abhängigkeit von der Schocklänge wird vom säureunlöslichen labilen Phosphat bestimmt, das mit wachsender Schocklänge kontinuierlich abnimmt. Diese

Fraktion	lfd.Nr.	K	1'	3'	5'	10'
7' P	1	9,7	9,57	8,87	7,99	4,56
sre.unlös. 7' P	2	9,18	9,07	8,37	7,52	4,17
sre. lös. 7' P	3	0,57	0,50	0,50	0,47	0,39
sre.unlös. P	4	11,72	11,90	10,50	10,00	5,08
sre.unlös. stab. P	5	2,59	2,83	2,13	2,48	0,91
sre.lös. P	6	2,78	1,90	1,95	0,55	0,59
Gesamt P	7	14,50	13,80	12,45	10,55	5,67

Tab. 11 Phosphatgehalt von sieben Fraktionen (γ/ ml). Die Algen wurden in der 6. Std des Zyklus verschieden lange geschockt und am Ende des LDW analysiert.

Fraktion gilt als Maß (KUHL 1962) für die Polyphosphate in der Zelle, deren Synthese stark vom Energiehaushalt der Zellen abhängt. Denn hier zeigt sich für die Zelle unter ungünstigen Bedingungen bei ausreichender Energieversorgung eine Möglichkeit, den ADP-Spiegel zu ergänzen und damit die für viele Stoffwechselwege vorliegende ATP-Hemmung aufzuheben (KUHL 1960, BADOUR 1961, GIRAU 1972). Der Abfall des Polyphosphatgehaltes deutet auf ein niedriges ATP/ADP-Verhältnis hin, was durch die gefun-

dene Beeinträchtigung von Photosynthese und Atmung bestätigt werden könnte. An Hefen fand JUNKNICKEL (1971) durch 10 min Schocks bei 48° C eine völlige Verhinderung der Phosphataufnahme und Polyphosphatbildung, was die Interpretation der angeführten Befunde stützt.

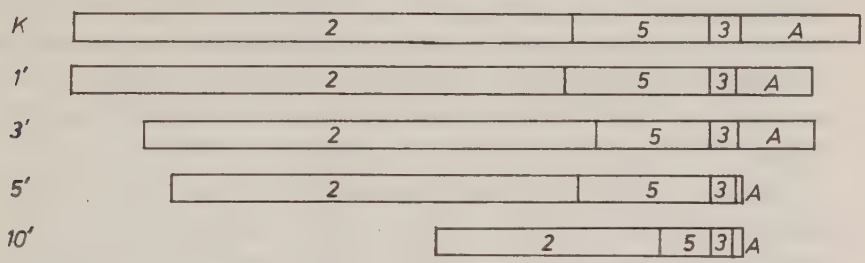

Abb. 34: Anteile einzelner Fraktionen am Gesamtphosphat von verschieden lange geschockten Kulturen am Ende des LDW. Die Ziffern bezeichnen die Nummer der Fraktionen in der Tab. 11.
Fraktion 6 = 3+A, Fraktion 1 = 2+3, Fraktion 4 = 2+5

Das säureunlösliche stabile Phosphat bleibt für die Kulturen mit 1 min, 3 min und 5 min Schock fast auf dem Wert der Kontrolle, fällt bei den 10 min geschockten Kulturen jedoch stark ab. Diese Fraktion kann als Anhalt für Veränderungen an den Nukleinsäuren und Phospholipiden der Membranen, also relativ stabilen Strukturen, dienen. So wird deutlich, daß die Schädigung der 10 min Kultur weitreichender ist, und der Befund hinsichtlich der Autosporenproduktion und der Chlorophyllsynthese dieser Kulturen wird unterstrichen. Für die säurelöslichen Phosphate zeigt sich, daß die Fraktion des säurelöslichen labilen Phosphates fast unverändert in allen Schockkulturen vorliegt. Hier gehen die Phosphatgehalte vieler Stoffwechsel-Intermediärsubstanzen mit ein. Der restliche Anteil der säurelöslichen Phosphate, in Abb. 34 mit A bezeichnet, wurde nicht weiter aufgetrennt, er besteht aus dem anorganischen Phosphat und dem säurelöslichen stabilen organischen Phosphat (KUHL 1958). Diese Fraktionen sind verantwortlich für die mit wachsender Schocklänge größere Abnahme der säurelöslichen Phosphatfraktion.

Da die meisten beobachteten Fraktionen gleichmäßig abnehmen, findet keine wesentliche Umlagerung des Phosphatgehaltes zu Gunsten einer bestimmten Fraktion statt. Unter Berücksichtigung des Verlaufs für den Gesamtphosphatgehalt scheint durch die Hitzebehandlung kein bestimmter Schritt im Phosphatstoffwechsel beeinträchtigt. Das hätte sich als Anhäufung eines Phosphates in bestimmten pools zeigen müssen. Die Aufnahme des Phosphates allerdings ist gestört, und das wird für viele andere Ionen auch gelten. Der Grund ist möglicherweise im Energiemangel der Zellen oder in Defekten ihrer Membranen zu suchen.

Bezieht man den Gesamtphosphatgehalt auf den Proteingehalt, erkennt man, daß diese Relation bis zum 5 min Schock nicht beeinflußt wird, beide Parameter sind gleichmäßig betroffen. Für die 10 min Schockkultur fällt der Wert ab und unterstreicht so die Resultate. Es soll noch darauf hingewiesen werden, daß die Schädigung beim Phosphatstoffwechsel bei weitem nicht so spontan auftritt,wie das für andere Parameter gilt.

VIII. Untersuchung des ATP-Gehaltes

Als Meßsystem wurde das Luziferin-Luziferasesystem benutzt. Dabei wurde durch die Wahl des geeigneten Extraktionspuffers (KRAPF 1971, STREHLER 1972) erreicht, daß die Aktivität dieses aus Feuerfliegen extrahierten Systems nur langsam und linear in Abhängigkeit von der Zeit abfällt. Dadurch ist es möglich, die Zählzeit der Proben zu verlängern und damit die Genauigkeit zu erhöhen. Um mit den Zählraten in einen vernünftig auswertbaren Bereich zu kommen, ergab sich die Notwendigkeit, die Algenkulturen mit höherer Zellzahl anzuimpfen. Analysen, die den Chlorophyllgehalt und die Autosporenproduktion erfaßten, zeigten, daß bei der Anzucht mit der rel. ZZ 200 (doppelte Zelldichte) die Bedingungen der Synchronkultur gewahrt blieben. Auch bei der Wirksamkeit der Schocks traten keine Veränderungen auf. Um Verdünnungen der Suspension durch Extrahieren der Algen in größeren kochenden Puffermengen zu vermeiden, wurden sie auf Membranfilter abgesaugt und mit diesen im Puffer extrahiert. Die Prozedur dauerte von der Probenentnahme bis zum Beginn der Extraktion ca. 15 sec. Wie sich herausstellte und

in Einklang mit HOLMS et al. (1972), LEWENSTEIN und SCHNEIDER (1972) sowie BÄCHI und ETTLINGER (1973), war diese Zeit zu lang und darf nach den hier erlangten Erfahrungen nicht länger als 7 sec sein. Sonst ergeben sich durch die krassen Änderungen der exogenen Begingungen große Veränderungen im ATP-pool, denen unten nachgegangen wird.

Das Abtöten und Extrahieren mit Perchlorsäure war für das hier verwandte Meßsystem nicht möglich. Im Gegensatz zu COLE et al. (1967) und LEWENSTEIN und SCHNEIDER (1972) und noch vielen anderen Verfassern stören nach Fällung mit KOH die auf Grund des Löslichkeitsproduktes im Extrakt zurückbleibenden ClO_4^- Ionen den Test. Diese Autoren arbeiteten mit einem anderen Testverfahren, bei dem nicht in einer verzögerten Phase der Alterung des Enzyms gearbeitet wurde. Aufgrund dieser Befunde war es notwendig, das im Methodenteil beschriebene Verfahren zu erarbeiten. Die für jede Messung erstellte Eichreihe wurde der gleichen Behandlung wie die Probe unterworfen und mit einer unbehandelten Eichreihe verglichen. Dabei ergaben sich geringe Differenzen, die um 10 % der Ausbeute lagen und bei der Standardisierung des Verfahrens konstant waren. Die Größenordnung des Verlustes deckt sich mit Angaben von KRAPF (mündl. Mitteilung). So sind bei den durchgeführten Messungen keine Verfälschungen zu erwarten, da immer auf eine mitdestillierte Eichreihe bezogen wurde.

Zuerst wurde der ATP-Gehalt einer Normalkultur und einer 10 min Schockkultur über den gesamten Zyklus verfolgt. Man findet (Abb. 35) einen stetigen Anstieg bis zum Ende der Lichtzeit, was sehr gut mit dem Verhalten des Chlorophylls übereinstimmt. Auch die Befunde über die anderen Parameter passen gut dazu. Das zeigt, daß diese Art der Kultivierung ein ausgewogenes Wachstum erlaubt; diese Beurteilung wird von COLE et al. (1967) bei Untersuchungen des ATP-pools an E. coli gestützt. Dort wurde ebenfalls bei idealen Wachstumsbedingungen diese Balance zwischen den Parametern gefunden. SYKES und GIBBON (1967) machten mit Vesikeln von Chlorobium thiosulphatophilum gleichartige Beobachtungen. Der gemessene ATP-Gehalt kann nur als Poolgröße verstanden werden, da ein turnover nicht erfaßt wurde. Die Poolgröße resultiert aus der

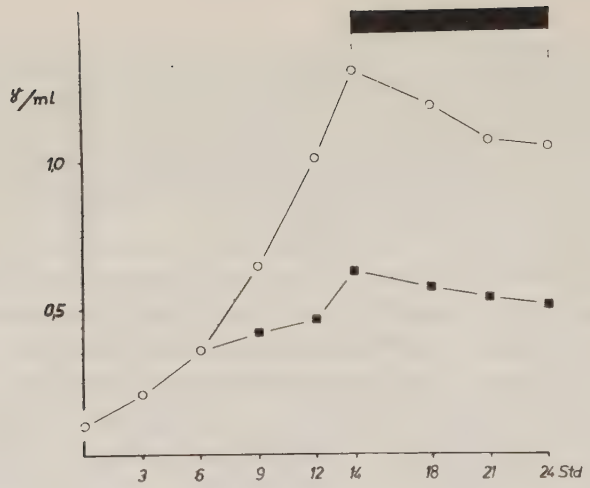

Abb. 35: ATP-Gehalt einer Normalkultur und einer in der 6. Std. des Zyklus 45° C D geschockten Kultur.
—— o —— Kontrolle —— ■ ——10' Schock

Lieferung der Photophosphorylierung, aus der oxidativen Phosphorylierung und aus dem Verbrauch in den Zellen. Die verschiedenen Anteile wurden zwar nicht gemessen, sollen jedoch weiter unten diskutiert werden.

Mit dem Beginn der Dunkelzeit fällt der ATP-Gehalt ab, die oxidative Phosphorylierung allein ist es, die jetzt ATP liefert. Dazu kommt noch der erhöhte Energieverbrauch, der, außer zur Synthese von Protein und anderen Zellinhaltsstoffen, vor allem durch die Zellteilungs- und Autosporen-Freisetzungsvorgänge verursacht wird. Die Erscheinung, daß der ATP-pool im Licht größer als im Dunkeln ist, fanden LÜTTGE et al. (1971) bei verschiedenen Höheren Pflanzen, so Atriplex spongiosa und Spinacea oleracea. Bei Zugabe von FCCP, einem Entkoppler vor allem der oxidativen Phosphorylierung, zeigte sich eine nur geringe Beeinträchtigung des ATP-pools. Eine unwesentliche Rolle der oxidativen Phosphorylierung im Licht wiesen RAMIREZ and SMITH (1968) an Rhodospirillum rubrum und Rhodopseudomonas spheroides nach.

Vergleicht man den Verlauf des ATP-Gehaltes einer in der 6. Std. des Zyklus 10 min bei 45° C D geschockten Kultur, verzögert sich die Zunahme an ATP bis zur 12. Std. des LDW. Das wird durch die Schäden am Photosynthese- und am Atmungsmechanismus bewirkt. In den beiden letzten Lichtstunden wird eine Erholung deutlich, allerdings werden am Ende der Lichtzeit nur weniger als 50 % des Gehaltes der Normalkultur erreicht. In der anschließenden Dunkelzeit fällt der Gehalt in beiden Fällen kontinuierlich ab.

Als nächstes sollte der Verlauf dieser Pool-Größe direkt nach dem Schock untersucht werden, indem in 1 min Abständen Proben entnommen wurden. Die Kulturen wurden nach dem Schock, während die Normalkultur ebenfalls verdunkelt war, den normalen Bedingungen ausgesetzt, und eine Minute später begannen die Messungen. Wie die Abb. 36 zeigt, steigt der Gehalt der Normalkultur beständig an, während die hitzebehandelte Kultur schon

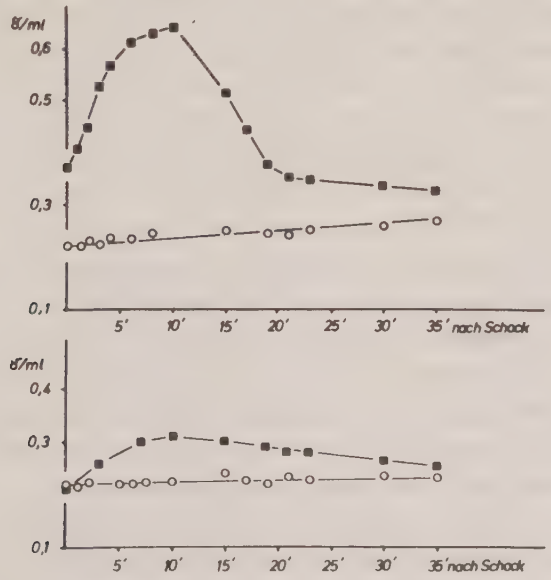

Abb. 36: Veränderungen im ATP-Gehalt in einer Normalkultur und einer in der 6. Std. des Zyklus 45° C D geschockten Kultur während 35 min nach dem Schock. Im Anschluß an den Schock Normalbegasung (oben) bzw. N_2-Begasung (unten).
—— o —— Kontrolle —— ■ —— 10' Schock

am Ende des Schocks einen deutlich höheren ATP-Gehalt aufweist. Der Gehalt steigt dann in den nächsten 10 min stark an, um dann ebenso deutlich abzufallen. Nach 35 min vom Schockende an gerechnet ist zu erkennen, daß diese Kultur wenig später mit ihrem ATP-Gehalt unter dem der Kontrolle liegen wird. Dieser zunächst überraschende Befund findet seine Erklärung, wenn man die hier nur kurzfristige Atmungssteigerung berücksichtigt. Diese fanden viele Autoren, so TRUKHIN (1970) an Chlorella, HEW et al. (1969) an Tabakblättern, die auf 40° erwärmt wurden, und ITAI und BENZIONI (1973) an 10 min mit 48° C behandelten Blättern vom Tabak. Werden die geschockten Kulturen im Anschluß an den Schock ins Dauerdunkel gebracht, so findet sich der beschriebene Verlauf ebenfalls (Abb. 37). Der höchste Wert nach 10 min liegt leicht unter dem im Licht erreichten. Anscheinend wird im ersten Fall zu diesem Zeitpunkt doch noch ATP aus der Photosynthese geliefert. Werden die Algen jedoch vor dem Schock 30 min mit N_2 begast, das fast völlig O_2-frei ist, so findet sich schon direkt nach dem Schock kein höherer ATP-Gehalt in den hitzebehandelten Kulturen. Weiter zeigt Abb. 36 einen leichten Anstieg der Schockkulturen, der zu einem leichten Maximum nach 10 min führt. Dann fällt die Kurve ab. Die Normalkultur zeigt unter diesen Bedingungen, bei denen allein die Glykolyse ablaufen kann (KYLIN und TILLBERG 1967), eine leichte Zunahme des ATP-Gehaltes über die gesamte Meßzeit.

Der oben beobachtete höhere Gehalt an ATP in der Schockkultur scheint also auf einer kurzfristigen Stimulierung der Atmung zu beruhen. Da aber auch viele ATP verbrauchende Prozesse im weiteren Verlauf nach dem Schock beeinträchtigt sind, und eine Schädigung der Atmung vorliegt, ist der Abfall in der Schockkultur außer auf direkte Hitzebeeinflussung auch auf regulatorische Prozesse zurückzuführen.

Nach dem Hitzeeinfluß sollte auch die Beeinflussung des ATP-Gehaltes durch den Dunkel-Licht-Übergang zu Beginn der Lichtzeit und die Licht-Dunkel-Veränderung in der 14. Std. des Zyklus untersucht werden. Denn bei diesen Übergängen wird für die Zelle beim Zuschalten bzw. Wegfall der Photosynthetischen ATP-Produktion eine Regulation notwendig, um den Energiebedarf zu decken. Die Abb. 37 zeigt die Befunde auf.

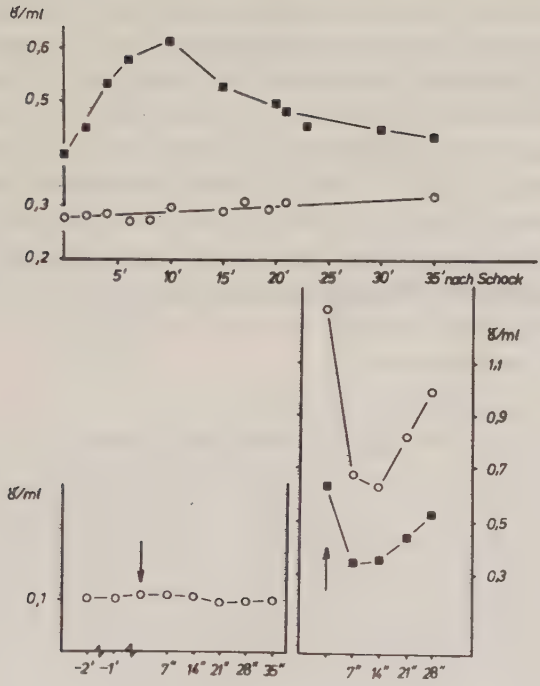

Abb. 37 (oben): Veränderungen im ATP-Gehalt in einer Normalkultur und einer in der 6. Std. des Zyklus 45° C D geschockten Kultur während 35 min nach dem Schock. Im Anschluß an den Schock verdunkelt.

(unten): Veränderungen im ATP-Gehalt in einer Normalkultur und einer in der 6. Std. des Zyklus geschockten Kultur bei dem im LDW üblichen Licht-Dunkel-Übergang (rechts). Zum Vergleich ist links das Verhalten beim Dunkel-Licht-Übergang angegeben.

—— o —— Kontrolle —— ■ —— 10' Schock

Der Dunkel-Licht-Wechsel wurde stets mit frisch verdünnten Autosporen zu Beginn des Zyklus gemessen. Es ergab sich praktisch keine Veränderung des ATP-pools in 35 sec. Die Probenentnahme konnte in 7 sec Abständen durchgeführt werden. Hier entsteht ein Widerspruch zu den von LEWENSTEIN und SCHNEIDER (1972) an Chlorella gemachten Befunden, bei denen mit "Licht an" ein Anstieg um 50 % des ATP-Gehaltes erfolgte. Der Grund für das unterschiedliche Ergebnis kann in der unterschiedlich langen Vorverdunklung (dort 2 Std., hier 10 Std.) und vor allem im verschiedenen physiologischen Zustand der Algen liegen. Die Verfasser zogen die Algen in einem Turbidostaten unter Dauerlicht-Bedingungen. Dagegen stimmt das hier gefundene Ergebnis mit der typischen Anfangsphase der Produktion bei synchronen Autosporen gut überein.

Für den Licht-Dunkel-Übergang ergaben sich sehr große Veränderungen, die bei diesen herangewachsenen Algen in der 14. Std. des Zyklus mit den Befunden bei den genannten Autoren gut korrelieren. Wie Abb. 37 zeigt, fällt der ATP-Gehalt in den 14 sec nach "Licht aus" ungefähr auf die Hälfte seines Gehaltes im Licht. Das gilt auch für die hitzebehandelte Kultur. Im weiteren Verlauf steigt er wieder an und erreicht schon nach 35 sec fast den gleichen Wert wie im Licht. Die geschockte Kultur läßt das Gleiche erkennen. Ihre Regulationsfähigkeit ist somit durch den Schock nicht beeinträchtigt.

Die Kompensation des ATP-Verlustes durch Wegfall der photosynthetischen Produktion geschieht durch ein Forcieren der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und erfolgt kolossal schnell. Das kann nur durch eine prompte Nachrichtenübermittlung entweder durch das ATP selbst, wozu es aus den Chloroplasten ins Cytoplasma gelangen muß (siehe KRAUSE 1971), oder durch andere Überträger ($NADPH_2$?) geschehen. Es kann auch sein, daß vor der völligen Umschaltung auf die Atmung eine Zwischenregulation in den Prozess eingreift, etwa durch eine Aktivierung der Adenylat-Kinase. Das soll im Rahmen der ADP-Bestimmung noch unten aufgegriffen werden.

Ein Hinweis auf die Beeinflussung des ATP-pools durch Veränderung der Beleuchtungsstärke findet sich auch bei SIMONIS und URBACH (1973) sowie HEBER (1973), der bei Chloroplasten in

wenigen Sekunden einen raschen Abfall konstatierte, wenn er die Lichtenergie auf $^1/_4$ des Ausgangswertes herabsetzte.

LEWENSTEIN und SCHNEIDER (1972) dehnten ihre Messungen nach dem Wechsel der Belichtungsbedingungen länger aus und fanden ein Oszillieren des Pools mit einer Phasenlänge von 40 sec, die sich nach 2,5 min auf 10 min verlängerte und sich mit verringernder Amplitude schließlich auf den Dunkelwert einstellte. Die erste Phasenlänge konnte durch das in Abb. 37 dargestellte Ergebnis bestätigt werden. Die hier aufgezeigte Schwingung findet sich auch bei der geschockten Kultur; die Amplitude ist viel geringer, was auf den deutlich kleineren Anteil der photosynthetischen ATP-Produktion in den Algen hinweist.

IX. Untersuchung des ADP-Gehaltes

Zuerst wurden Verläufe für eine Normalkultur und eine Schockkultur über den gesamten Zyklus der Algen aufgenommen (Abb. 38). Der Verlauf in der Normalkultur ähnelt dem des ATP-Gehaltes sehr. Auffallend ist jedoch die lange Produktionsverzögerung zum Beginn des Zyklus, die sicherlich darauf beruht, daß über die Photosynthese beinahe schneller ATP gebildet wird, als die Algen in der Lage sind, das Nukleotid zu synthetisieren. Die Kurve steigt dann ähnlich den anderen Wachstumsparametern bis zur 14. Std. an. Danach erfolgt ein Abfall, der deutlich steiler ist als der der ATP-kurve und erkennen läßt, daß die oxidative Phosphorylierung das Angebot an ATP möglichst groß hält. Die ADP-Kurve verläuft dann leicht fallend bis zum Ende des Zyklus.

Betrachtet man den Verlauf des ADP in einer geschockten kultur, so wird deutlich, daß durch den Schock eine ausgeprägte 6 Std. lange Verzögerung, wie sie schon häufiger gezeigt wurde, bewirkt wird. In den letzten beiden Lichtstunden kommt es zu einer Erholung. Die Kurve fällt dann erst rasch, später langsam bis zum Ende des Zyklus ab.

Bildet man den Quotienten ATP/ADP (vgl. Abb. 38), so ist ein deutlicher Abfall bis zum Ende der Lichtzeit festzustellen. Das Gleichgewicht verändert sich langsam zu Gunsten des ADP,

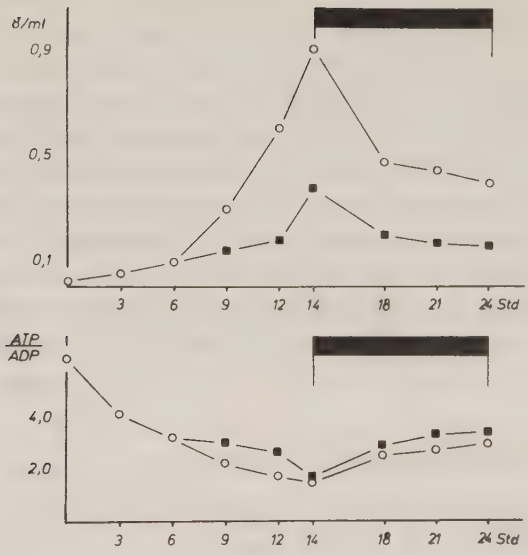

Abb. 38: ADP-Gehalt (oben) einer Normalkultur und einer in der 6. Std. des Zyklus 45° C D geschockten Kultur. Verlauf des Quotienten ATP/ADP (unten).
—— o —— Kontrolle —— ■ —— 10' Schock

wobei man beachten muß, daß die anlaufende Photosynthese zu Beginn des Zyklus die Relation stark zu Gunsten des ATP verschiebt. Nach dem Beginn der Dunkelzeit steigt der Quotient wieder leicht bis zum Ende des Zyklus an; die nun allein ablaufende Atmung bewirkt diese Verschiebung.

Bei der geschockten Kultur ergibt sich von der 12. Std. des Zyklus an ein gleicher Verlauf. Vorher scheint sich das ATP/ADP-Verhältnis nur wenig zu ändern, was die Befunde, daß der Schock die gesamten Stoffwechselvorgänge beeinträchtigt, bestätigt. Die Erholung äußert sich in einem stärkeren Abfall, der wohl durch erhöhten ATP-Bedarf bei der Regeneration der Zellen auftritt. Generell liegt der Wert des Quotienten für die Schockkultur über dem der Normalkultur, was durch eine Beeinträchtigung energieverbrauchender Reaktionen oder aber in einer

gesteigerten ATP-Bildung bedingt sein könnte. Letzteres ist jedoch auf Grund der vorher festgestellten Schädigungen unwahrscheinlich.

Bei Beleuchtungsveränderungen (Abb. 39) läßt der ADP-Gehalt mit Lichtbeginn keine schnellen Veränderungen erkennen.

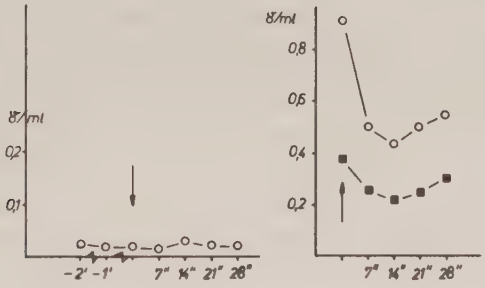

Abb. 39: Veränderungen im ADP-Gehalt einer Normalkultur und einer in der 6. Std. des Zyklus geschockten Kultur bei dem im LDW üblichen Licht-Dunkel-Übergang (rechts). Zum Vergleich ist links das Verhalten beim Dunkel-Licht-Übergang angegeben.
—— o —— Kontrolle —— ■ —— 10' Schock

Überraschend ist, daß beim Licht-Dunkel-Übergang der ADP-Gehalt gleichsinnige Veränderungen wie der ATP-Gehalt aufweist. Dieser Befund, der dem von URBACH und KAISER (1972) an isolierten Chloroplasten gemachten widerspricht, weist auf eine Regulationsmöglichkeit des ATP-Pools in intakten Algen hin. Es scheint diesen Zellen möglich zu sein, das nach dem plötzlichen Wegfall der photosynthetischen ATP-Produktion eigentlich überschießende ADP - denn die ATP-verbrauchenden Reaktionen laufen ja weiter - mit Hilfe einer Myokinase nach der Gleichung

$$2\ ADP \xrightarrow{Myokinase} ATP + AMP$$

umzuwandeln. Zwar ist dieser Weg nicht so sehr ergiebig, aber so kann ein plötzlicher ATP-Mangel sicherlich überbrückt und ein Anstau des auch regulatorisch wirksamen ADP unterbunden werden. Der ebenso wie beim ATP-Gehalt einsetzende Anstieg, der

deutlich schwächer als der des ATP ist, kommt möglicherweise durch Eigenschwingungen, wie LEWENSTEIN und SCHNEIDER (1972) sie für das ATP annahmen, zustande, für die sich bisher keine befriedigende Erklärung finden läßt. Es kann auch sein, daß die Regulation einer Myokinaseaktivität über die oxidative Phosphorylierung durch das von dieser produzierte ATP erfolgt. Die Myokinase würde dann also gehemmt, bevor die Atmung das vorhandene ADP völlig in ATP überführt hat. Das sind aber bisher ungeklärte Möglichkeiten, denen bei Untersuchungen über die Regulation des Energiestoffwechsels nachgegangen werden sollte.

D I S K U S S I O N

Neben den Einflüssen von langfristigen Temperaturwechseln wurde die Beeinflussung des Stoffwechsels durch Hitzeschocks unterschiedlicher Länge untersucht. Die Erhöhung der Chlorphyllausbeute durch die Anwendung von langen Perioden höherer Anzuchttemperatur läßt den Schluß zu, daß die Normaltemperatur nicht für alle Syntheseschritte die optimalen Bedingungen schafft. Aber es ist sicherlich falsch, anzunehmen, daß generell eine Erhöhung der Produktion erreichbar ist. Recht schnell tritt als Indiz für die Beeinträchtigung des Wachstums eine Desynchronisierung der Kulturen ein. Auffallend ist die relative Empfindlichkeit des Systems direkt nach Lichtbeginn. Wirkt hier doch eine Hitzebehandlung deutlich schädigender als es bei der Anwendung später im Zyklus der Fall ist. Es wäre interessant, diese Phase dahingehend genauer zu untersuchen, um möglicherweise eine Reihenfolge der Induktion verschiedener Stoffwechselvorgänge festzustellen und diese mit den Hitzeschäden zu korrelieren.

Besonders in Bezug auf das Einsetzen der photosynthetischen Aktivität, bei der eine Umordnung oder Anordnung von Pigmentstrukturen bis zur vollen Leistungsfähigkeit bekannt ist (vgl. Befunde von GIMMLER 1973 an Dunaliella), könnten detaillierte Untersuchungen Aufschlüsse über die stets zu findende Phase geringer Produktion erlangt werden. Für den enzymatischen Bereich der Photosynthese liegen Untersuchungen von DÖHLER (1972, 1973) an Chlorella und Anacystis vor.

Ganz entscheidend für die Chlorophyllsynthese ist die Reihenfolge der verwendeten Temperaturen. Die hauptsächliche Synthese, falls noch eine erfolgt, läuft in der Dunkelzeit des Zyklus ab, wenn in der Lichtzeit die hohe Temperatur vor 32° C appliziert wurde. Hohe Temperatur nach Normaltemperatur bewirkt gerade in der Hitze die größte Zunahme. In der anschließenden Dunkelzeit erfolgt praktisch kein weiterer Anstieg. Das laufende System, das Gelegenheit hatte, ausreichend Chlorophyllvorstufen zu bilden, kann somit durch Hitzegaben forciert werden. Eine frisch gestartete, in der Phase verzögerten Wachstums befindliche Kultur wird offenbar schon an der Bildung der Vorstufen nachhaltig gehindert.

Diese Eingriffe der hohen Temperatur zeigten sich auch in der Pigmentausrüstung der Zellen. Der Carotinoidgehalt in den Algen, die lange der hohen Temperatur ausgesetzt waren, ist deutlich größer. Die Analyse der Fettsäuren deutet in die gleiche Richtung und läßt am Auftreten vieler nur als Abbauprodukte zu deutender Zwischenstufen die große Beeinträchtigung der Algen erkennen. Ähnliche Befunde konnten auch von FORDE und BALLATINE (1970) an den Chloroplasten von Sojabohnen gemacht werden, bei denen hohe Temperatur und hohe Lichtintensität die Granastruktur und die Chloroplastenlipide reduzierten. Die Analysen von Algen, die 2 Zyklen in der hohen Temperatur von 41° C zubrachten, sind als extreme Daten zu werten. Denn diese Zellen sind, wie eine Weiterkultur ergab, nur noch teilweise zu normalem Wachstum fähig. Aber auch schwächer geschädigte Zellen (1 Zyklus 41° C) ließen die gleiche Art der Schädigung erkennen.

Durch die Anwendung gleich langer Abschnitte von unterschiedlichen Temperaturen kristallisierte sich die von 42° C deutlich als kritischer Wert heraus. Kurze Einwirkungszeiten erlaubten beinahe ein Erreichen der Kontrolle, wenig längere Behandlung ließ den Gehalt an Chlorophyll stark absinken. Dabei wurden zwei Bereiche im Zyklus deutlich, die für die weitere Betrachtung interessant sind. Der Bereich um die 5.-7. Std. des Zyklus ist besonders gut zu beeinflussen (Abb. 11). Durch schonende Behandlung (wozu 0,5 Std. bei 42° C durchaus noch zählt), kann auch in dieser empfindlichsten Phase fast noch der Kontrollwert erreicht werden. Aber bei längerer Beeinflussung bildet sich gerade hier ein Minimum aus. Anscheinend ist diese Phase, charakterisiert durch den Beginn des logarithmischen Wachstums (RUPPEL 1962), äußerst sensibel. Der andere Bereich liegt nach der 1.-2. Std. des Zyklus; sind hier die Algen doch oftmals - besonders bei starker Hitzebeeinflussung - (vgl. Abb. 11 u. 12) in der Lage, diese besser zu überstehen als vor oder nach diesem Zeitpunkt. Eine Erklärung für diese verringerte Chlorophyllsynthese kann nicht gegeben werden, zeigt diese Phase sonst keine physiologischen Besonderheiten.

Die Aufnahme von Tieftemperaturspektren, die eine bessere Auflösung der Pigmentformen gewährleisten, unterstreicht durch große Verschiebungen in der Pigmentausstattung der Zellen diese Befunde. Den deutlichsten Effekt auch ohne eine zur ausführlichen Auswertung unbedingt notwendige Computeranalyse erbrachte die Untersuchung stark geschädigter Algen. Die sicherlich durch das Auftreten von Chlorophyllabbauprodukten bewirkte qualitative Veränderung im Spektrum solcher Algen ist neben den quantitativen für den Ausbleichvorgang nach so starkem Hitzeschock (s.u.) verantwortlich. Auch schwächer geschädigte Kulturen wiesen diese Tendenz zur Verschiebung der Maxima auf, allerdings bringt hier die Auswertung ohne bessere Methoden nicht so klare Ergebnisse. Aus unseren Untersuchungen wird deutlich, daß auch im Bereich der Pnotosynthese sicher starke Beeinflussungen zu erwarten sind. Denn wie auch BROWN (1969) und MICHEL-WOLWERTZ (1969) betonen, sind so starke qualitative Veränderungen der Pigmentausrüstung stets mit Beeinträchtigungen der Pnotosynthese gekoppelt.

Die Anwendung von 20 min Schocks wurde stets so gewählt, daß die Zeit in der hohen Temperatur im Dunkeln verbracht wurde. (Abkürzung: 45° C D). Wie LORENZEN (1963) zeigen konnte, hat diese Behandlung die größte Effektivität, und es konnte die empfindlichste Phase besser festgelegt werden, als wenn der Schock im Licht erfolgte. Analysen nach einem 20 min Schock bei 45° C im Dunkeln ließen erkennen, daß die Produktion von kohlenhydrat, Protein und Chlorophyll stark behindert wurde. Der Chlorophyllgehalt nahm im Verlauf der weiteren Anzucht nach dem Schock sogar ab. Besonders stark waren die Schädigungen in der 6. Std. des Zyklus, der Phase höchster Empfindlichkeit. Nach einem Schock in dieser Zeit sank auch der Proteingehalt leicht ab.

Algen nach einer Std. Wachstum geschockt überstehen die Behandlung etwas besser als solche, die sofort mit Lichtbeginn der Hitze ausgesetzt waren.

Hitzebehandlungen durch Schocks, wobei, wie sich an der Untersuchung von drei Parametern zeigte, 20 min als zu langer Schock beurteilt werden müssen, konnten durch geeignete Apparaturen so erfolgen, daß im Minutenbereich gearbeitet wird.

Das hat den Vorteil, daß eine Reihenfolge der Schädigungen unterschiedlicher Stoffwechselwege durch hohe Temperatur festgestellt werden kann. Durch die kurze Einwirkungszeit ist auch die Gefahr von Adaptationsvorgängen in den Zellen geringer, was bei der Anwendung von Kältebehandlungen, die im Stundenbereich gegeben werden (LORENZEN 1963), als Fehlerquelle eine Rolle spielen kann.

Nach Vorversuchen wurden die Schocks von 1, 3, 5, 10 und 15 min Dauer (45° C D) zur sinnvollen Weiterarbeit ausgewählt. Wie die Beobachtung der verschiedenen Wachstumsparameter zeigte, ist es so behandelten Zellen noch möglich, Synthesen durchzuführen. Selbst Zellteilungen laufen nach Schocks bis zu 8 min Dauer noch ab, auch wenn von einer Schocklänge von 6 min an eine Desynchronisierung der Kulturen einsetzt. Der Befund von EVENSON und PRESCOTT (1971) an Euplotes zeigt, daß die DNA-Synthese nach einem totalen Stopp am Ende des Hitzeschocks erst langsam und nach Reperaturen an der DNA wieder einsetzt. Der Kohlenhydrat- und der Proteingehalt werden herabgesetzt, ersterer in nicht so starkem Maße. Beim Chlorophyll, das viel empfindlicher reagiert, ist die stärker werdende Schädigung mit schrittweiser Verlängerung der Schockdauer besonders deutlich zu erkennen. In der halblogarithmischen Darstellung zeigt sich, daß nach dem Schock eine länger ausgeprägte Verzögerung der Synthese folgt, der dann beim 3 und 5 min Schock noch eine kürzere logarithmische Zunahme angeschlossen ist. Einen ähnlichen Befund erhielten ONWUEME und LAWANSON (1973) an etiolierten Keimlingen.

Nachdem gesichert war, daß der Lichtsättigungswert der photosynthetischen O_2-Produktion für hitzebehandelte und normale Algen gleich war, wurde diese gemessen. Die Resultate unterstützen die bisherigen Befunde. Der Kurvenverlauf war ähnlich wie beim Chlorophyll; allerdings war die Stagnation nach dem Schock nicht gegeben. Es wurde deutlich, daß bei gleichem Chlorophyllgehalt in den geschockten Kulturen zeitweilig mehr O_2 produziert wird als in der Kontrolle. Das trifft besonders für die 5 min und 10 min geschockten Kulturen zu und zeigt die Erholung des O_2 entwickelnden Mechanismus nach 3 bzw. 5 Std. nach dem Schockende. Die stark verzögerte Chlorophyllzunahme

(5 min Schock) bzw. der Chlorophyllverlust (10 min Schock) gehen vorwiegend auf Kosten der accessorischen Pigmentformen, nicht jedoch der in den Reaktionszentren befindlichen (vgl. Abb. 20 u. 26). Bei der absoluten O_2-Produktion, bezogen auf ml Suspension, wurde deutlich, daß ihre Beeinträchtigung sofort nach dem Schock viel stärker ist als die des Chlorophyllgehaltes. Hier liegt also eine schneller eintretende Schädigung vor. Allerdings findet man schon eine Erholung, während beim Chlorophyll noch eine Stagnation bzw. eine stark verzögerte Zunahme oder sogar eine Abnahme zu beobachten ist. Ähnliche Befunde erhielten BENZIONI und ITAI (1972) an Tabakblättern. Sie maßen die CO_2-Fixierung nach Hitzeschocks und fanden schon 2,5 Std. nach dem Schock eine erkennbare Erholung.

Nach diesem Ergebnis lag es nahe, zu vermuten, daß die Hitzeschädigung an den Photosystemen und evtl. an beiden unterschiedlich stark, noch schneller zu bemerken sein würde. Der Einfluß kurzzeitiger Hitzeeinwirkungen auf die Photosysteme wurde bereits von mehreren Verfassern untersucht. So fanden MUKOHATA et al. (1973a) an geschockten Spinat-Chloroplasten neben der Beeinträchtigung der O_2-Entwicklung und des PS II eine Reduktion der Photophosphorylierung und damit des Verhältnisses ATP / $2e^-$, das bei einer Einwirkungszeit von über 5 min bei 45° C beinahe Null erreicht. Mit Hitzeeinflüssen auf die Photosysteme beschäftigten sich auch KATOH und SAN PIETRO (1967), STUART und GAFFRON (1972), STUART (1971). HAVEMANN und DONZE (1972) fanden an Spinat-Chloroplasten, die auf 55° C erhitzt wurden, eine Verhinderung der O_2-Entwicklung, nicht jedoch eine Inaktivierung der PS II Reaktionszentren. Die normale Hillreaktion war nach 3 min 30° C zu 50 % beeinträchtigt, während eine mit Hydrazobenzen, einem e^- -Donator für das PS II, gemessene Reaktion dieselbe Verlustrate nach 5 min bei 55° C erreichte. DÖRING und WITT (1972) wiesen neben anderen Autoren auf den Angriffspunkt der Hitzebeeinflussung zwischen der Photolyse des Wassers und dem PS II Reaktionszentrum hin und fanden, daß der e^- -Transport in Spinat-Chloroplasten nach 5 min 44° C Behandlung zu 50 % zerstört ist. Dagegen weist das PS II Zentrum erst nach 5 min bei 55° C eine gleich hohe Schädigung auf. Eine starke Beeinträchtigung der Hillreaktion fanden auch HINKSON und VERNON (1959)beim Erhitzen

von Spinat-Chloroplasten über 30 min auf 51° C. Durch 1 min Erhitzen auf 50° C fanden EMMEL und WALKER (1970) eine abgeschwächte Reaktion der Hillreaktion auf NH_4Cl. Da sie kurzfristig eine Steigerung der Hillreaktion nachwiesen, interpretierten sie den Befund als eine Entkoppelung der PS II Reaktion durch den Hitzeschock. Selbst an der gut an hohe Temperaturen angepaßten Alge Cyanidium caldarium fanden BECKER und SCHMELLENKAMP (1972) bei der Erhöhung der Temperatur für 30 min über das Optimum von 50° C eine Beeinträchtigung der Photosynthese und vor allem der CO_2-Fixierungsprodukte.

Soweit die Befunde der einzelnen Autoren hinsichtlich der Höhe der Temperaturen und Dauer der Einwirkungszeit auch differieren, wird aus allen diesen Ergebnissen doch deutlich, wie schnell eine tiefgreifende Schädigung der Photosysteme durch Hitzeeinwirkung geschehen kann.

Die eigenen Befunde passen recht gut in dieses Bild. Ist doch, wenn direkt am Ende des Schocks die Aktivität der beiden Photosysteme gemessen wird, schon nach einem 3 min Schock das PS II zu 60 % und das PS I zu 40 % geschädigt. Das PS II ist also deutlich empfindlicher als das PS I. Vergleicht man diese Beeinträchtigung mit der auf den Chlorophyllgehalt bezogenen O_2-Produktion bei dem gleichen Schock, so findet man ein Absinken um 40 % des Wertes gegenüber der Kontrolle. Es scheint hier so zu sein, daß das PS II schneller und auch stärker direkt nach dem Schock geschädigt ist. Gibt man den Algen Zeit zur Erholung, steigt die Aktivität der Photosysteme wieder an, und hier ist das PS II das bevorzugt regenerierte System. Die oftmals beschriebene Empfindlichkeit des PS II gegen unvorteilhafte Behandlung scheint auch mit einer, für photosynthetische Organismen sinnvoll erscheinenden, besseren Regenerationsfähigkeit verbunden zu sein. Dabei erreicht dieses PS bei einem Schock bis zu 5 min (45° C D) am Ende des Zyklus fast 90 % der Kontrolle, was für keinen der anderen Parameter zutrifft. Von diesen erreicht der Proteingehalt mit 75 % für diesen Schock die höchste Regeneration. Allerdings ist gerade hier die Schädigung im Verlauf nach dem Schock nicht sehr ausgeprägt. Die Photosysteme besitzen in der 6. Std. des Zyklus ein deutliches Aktivitätsmaximum, was die physiologische Bedeutung dieser Phase unterstreicht.

Die den photosynthetischen Apparat betreffende Schädigung ist nur zu einem geringen Teil einem bestimmten Spektralbereich des nach dem Schock einwirkenden Lichtes zuzuschreiben. Zwar deutet der Befund auf eine etwas größere schädigende Wirkung von Rotlicht, aber die Überlagerung durch einen Starklicht - Schwachlichteffekt ist erkennbar (Abb. 31). Bei Euglena fand LYMAN (1970) keine unterschiedliche Wirkung von Rot- und Blaulicht auf das Ausbleichen der Zellen nach Hitzebehandlung.

Bei der Untersuchung des Lipidgehaltes wurde vom Gesamtlipidgehalt der in diese Bestimmung mit eingehende Chlorophyllgehalt abgezogen, um einen Anhalt für die Beeinträchtigung der lipidhaltigen Strukturen, die von mehreren Autoren belegt sind (BENZIONI und ITAI 1973, JUNKNICKEL 1971), zu erhalten. EMMEL und WALKER (1970) nehmen eine durch den Hitzeschock bewirkte kurzfristige Verflüssigung des Lipidanteils in den Thylakoidmembranen der von ihnen untersuchten Spinat-Chloroplasten an. Wir fanden eine Reduktion des Lipidanteils mit wachsender Schocklänge. Diese Beeinträchtigung gehört, wie es auch zu erwarten war, zu den weniger ausgeprägten Folgeerscheinungen.

Eine Schädigung an den Membranen führt dazu, daß die Aufnahme von Ionen behindert ist. Die Untersuchung über den Verlauf des Phosphatgehaltes diente als Indikator dafür. Tatsächlich sind hier bereits eine halbe Stunde nach dem Schock Unterschiede festzustellen. Die Aufnahme dieses wichtigen Ions ist deutlich mit zunehmender Schocklänge behindert. Für den 3, 5 und 10 min Schock zeigt sich bis 1,5, 2,5 und 4 Std. nach dem Schock eine verzögerte Zunahme am Gesamtphosphat. Dann wird bis zum Ende des Zyklus die Aufnahmerate wieder größer. Die Fraktionierung der Phosphate am Ende des LDW zeigte eine gleichmäßige Beeinträchtigung der einzelnen Fraktionen, von denen lediglich das säurelösliche labile Phosphat eine etwas größere Stabilität aufwies.

Die vorübergehende Hemmung der Ionenaufnahme im Zusammenhang mit der Beeinträchtigung der Photosynthese und der anderen Synthesen verlangten eine Untersuchung des Energiehaushaltes, eine Bestimmung des ATP-Gehaltes. Dabei sollten exemplarisch der 10 min Schock und die Normalkultur zum Vergleich herangezogen werden. Die Regulation dieses Nukleotidpools geschieht

sehr schnell, und um überhaupt Veränderungen zu erfassen, wurde der 10 min Schock ausgewählt.

Die erarbeitete Präparationsmethode mit dem Abtöten in siedendem Methanol war für die hier benutzte Anzucht und Testbedingungen am geeignetsten. Das Einengen zur Entfernung des Methanols ist etwas zeitraubend, aber so können Probenentnahmen in sehr kurzen Zeitabständen vorgenommen werden. Mögliche Fehlerquellen wurden durch eine Vielzahl von Vorversuchen und durch eine stets mitgeführte Eichkurve eliminiert. So kann diese Methode, im Methodenteil genau ausgeführt, für die ATP- und ADP-Bestimmung in dünnen Algensuspensionen empfohlen werden.

Der ATP-Gehalt steigt in den wachsenden Synchronkulturen kontinuierlich an und erreicht zum Ende der Lichtzeit den höchsten Wert. Dieses ATP wird durch die Photosynthese und die Atmung geliefert. GIMMLER et al. (1968, 1971) konnten, allerdings durch ein anderes Meßsystem, nachweisen, daß die ATP-Lieferung aus der Photosynthese zu Beginn des Zyklus vollsynchroner Ankistrodesmus braunii zumeist aus der zyklischen, in der Mitte der Lichtzeit vorwiegend aus der nichtzyklischen Photophosphorylierung kommt. Mit diesem Problem der ATP-Lieferung befaßten sich auch REEVES und HALL (1973), die im nichtzyklischen Transport zwei ATP-Stellen nachwiesen. Befunde von KYLIN und TILLBERG (1967), KOLB et al. (1972) sowie von BORNEFELD et al. (1972) an verschiedenen Grünalgen und an Anacystis weisen in gleiche Richtung. Die unterschiedlichen Quellen, aus denen das ATP während der Lichtzeit stammt, könnten erklären, weshalb hier mit Beginn der Lichtzeit keine so ausgeprägte verzögerte Phase wie beim Chlorophyll festzustellen ist.

Der ADP-Gehalt unserer Zellen zeigt das gleiche Verhalten, allerdings ist das bei diesen im Wachstum befindlichen Kulturen auch nicht verwunderlich. Mit dem Ende der Lichtzeit fallen die Kurven für ATP- und ADP-Gehalt beide ab. Letztere allerdings deutlich stärker, was auf ein erhöhtes Angebot an ATP durch die Atmung in den Zellen zurückzuführen ist. Das Angebot ist für die ablaufenden energieverbrauchenden Synthesen nicht begrenzend, wie der geringere Abfall des ATP-Gehaltes bei weiter steigenden Synthesen zeigt.

Für die geschockte Kultur ergibt sich nach dem Schock ein stark verzögertes Ansteigen des Gehaltes. Erst in den beiden letzten Lichtstunden ist eine höhere Syntheserate festzustellen. Der Schock, der die O_2-Produktion sehr beeinträchtigt und die Photosysteme stark schädigt, wurde in der Phase gegeben, in der die photosynthetische ATP-Lieferung vorwiegend über die nichtcyklische Photophosphorylierung stattfindet (GIMMLER et al. 1971). Aber ein Umschalten, wie es URBACH und KAISER (1972) fanden, ist den so behandelten Zellen nicht möglich, wie die Untersuchung der Photosystemaktivitäten zeigte. Auch eine Dekkung des Bedarfs durch die Atmung kann nicht erfolgen, so daß in der Beeinträchtigung des Energiegleichgewichtes eine der Hauptschädigungen durch den Hitzeschock gesehen werden muß.

Interessant ist auch das Verhalten der Schockkultur in Bezug auf den ATP-Gehalt kurz nach dem Schock. Fällt die Photosystemaktivität schon während der Schockzeit drastisch ab, so zeigt sich beim ATP-Gehalt ein deutliches Überschießen über die Kontrolle. Dieses Ansteigen des Gehaltes kommt durch den Ausfall von ATP verbrauchenden Reaktionen, die Synthese von vielen verfolgten Parametern ist stark verzögert oder stagniert, und durch eine kurzfristig gesteigerte Atmung zustande. Denn auch im Dunkeln nach dem Schock zeigt sich ein ähnlicher Anstieg, und durch fast O_2-freie Begasung mit Stickstoff läßt sich das Ansteigen des ATP-Gehaltes deutlich einschränken. In der Normalkultur steigt der ATP-Gehalt kontinuierlich an und läßt unter den glykolytischen Bedingungen, die bei N_2-Begasung vorliegen, eine deutlich schwächere Zunahme erkennen. Dagegen ist der Unterschied zwischen der Produktion im Licht und der im Dunkeln nicht so wesentlich, was auf eine schnelle Regulation (URBACH und KAISER 1972, LEWENSTEIN und SCHNEIDER 1972) deutet.

Diese Umschaltung zwischen den ATP liefernden Stoffwechselwegen wurde bei den durch den LDW bedingten Dunkel-Licht- und Licht-Dunkel-Übergängen untersucht. Dabei zeigte sich eine deutlich verzögerte Zunahme in den Autosporen beim Anschalten des Lichtes, und es war kein so rascher Anstieg des ATP-pools zu finden, wie er von BORNEFELD et al. (1972) und URBACH und KAISER (1972) beschrieben wurde. Es ist sicherlich so, daß die jungen Autosporen durch die lange Verdunkelung und die allgemein

vorhandene Induktionsphase für fast alle Stoffwechselwege auch in der ATP-Produktion nicht in der Lage sind, sofort mit hohen Produktionsraten auf den Lichtbeginn zu reagieren. Die oben genannten Verfasser arbeiteten entweder mit Massenkulturen, mit Chloroplasten oder mit älteren Zellstadien. Beim Licht-Dunkel-Übergang in der 14. Std. des Zyklus zeigt sich bei der Normalkultur und bei der Schockkultur nach 7 sec ein drastischer Abfall des ATP-Gehaltes um 50-60 % durch den Wegfall der ATP liefernden Photosynthese. Nach 14 sec setzt ein Anstieg des Gehaltes ein, und erreicht nach 28 sec schon 80 % des Wertes vor dem Ende der Lichtzeit. Schwingungen, wie sie LEWENSTEIN und SCHNEIDER (1972) fanden, wurden hier nicht verfolgt, aber die erste Phase konnte wie beschrieben, erfaßt werden. Die Regulation zwischen der Photosynthese und der Atmung in Bezug auf den ATP-pool geschieht sehr schnell, und das erklärt die bei länger dauernden Ernteverfahren auftretenden, nicht reproduzierbaren Ergebnisse (vgl. HOLMS et al. 1972).

Es ist nicht auszuschließen, daß das Prinzip der Synchronisation (LORENZEN 1958) auch auf solchen schlagartigen Umstellungen des Stoffwechsels beruht, werden doch alle physiologisch ungleichen Zellen einer Massenkultur gezwungen, ihren Energiehaushalt mit Beginn der Dunkelzeit völlig umzuschalten. Nur einer begrenzten Zahl von Stadien ist es möglich, die Energieversorgung für so aufwendige Prozesse wie die Zellteilung unter diesen Begingungen aufrecht zu halten. Alle anderen Entwicklungsstadien werden nach einiger Zeit im Dunkeln aus Energiemangel - sie besitzen auch weniger veratembares Material - diesen Vorgängen nicht folgen können und sind zum Warten auf eine neue Produktionsphase gezwungen.

Wie die Untersuchung in der hitzeempfindlichsten Phase dieser Alge zeigen, sind alle verfolgten Stoffwechselwege von der Schockwirkung betroffen. Das trifft zum Beispiel für den ATP-Gehalt und den Gesamtphosphatgehalt zu, deren Relation (als ATP / Gesamtphosphat) in der Normalkultur und der Schockkultur über den gesamten Zyklus gleich ist. Selbst durch die Verkürzung der Schocklänge auf 1 min gelang es nicht, eine spezifische Beeinträchtigung eines Stoffwechselweges zu erreichen. Auch

dabei ist das gesamte Spektrum der untersuchten Parameter betroffen. Es sind schnell auftretende und erst im Verlauf der Weiterkultur erkennbare Schädigungen zu unterscheiden. Einige Prozesse zeigen bis zum Ende des LDW, in dem der Hitzeschock gegeben wurde, eine Erholung, andere benötigen bei stärkerer Einwirkung längere Erholungsphasen, z.B. benötigt die Autosporenproduktion beim 20 min Schock, nach der 1. Std. des Zyklus gegeben, weitere 24 Std.

Abschließend soll versucht werden, die Ergebnisse in der unten stenenden Tabelle zusammenzufassen und zu ordnen.

Zeitliche Reihenfolge der Beeinträchtigungen nach dem Schock	Reihenfolge der Regeneration am Ende des LDW (10 min Schock)
PS I + II	Protein
O_2-Produktion	Kohlenhydrat
Chlorophyll	Gesamtlipid
Zellzahl	ATP- ADP-Gehalt
ATP- ADP-Gehalt	Gesamtphosphat
Protein	Chlorophyll
Gesamtphosphat	O_2-Produktion
Kohlenhydrat	PS I + II
Gesamtlipid	Zellzahl

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Temperaturwechsel während der Lichtzeit (32° C / 39° C : 6 Std. / 8 Std.) führte bis 42° C, einer kritischen Temperatur, zu einer Erhöhung der Chlorophyllproduktion.

2. Tieftemperaturspektren ließen quantitative Unterschiede in der Pigmentausstattung erkennen. Bei Algen, die starken Streßsituationen ausgesetzt waren (vielstündige Behandlung 41° C oder kurzzeitige mit 45° C), ergaben sich auch qualitative Verschiebungen.

3. Die Auswirkung kurzer Schocks (1', 3', 5', 10' bei 45° C im Dunkeln) in der empfindlichsten Phase der Zellentwicklung (5.-7. Std. nach Lichtbeginn) wurde unter nachfolgenden Normalbedingungen untersucht (Abb. 19, 20, 22, 25).

4. Die Aktivität der Photosysteme während eines Zyklus wurde bestimmt und im Zusammenhang mit dem Chlorophyllgehalt und der O_2-Produktion unter Berücksichtigung der Befunde anderer Autoren diskutiert. Unmittelbar nach kurzen Schocks war das PS II deutlicher geschädigt. Am Ende des Zyklus war das PS I stärker beeinträchtigt.

5. Nach dem Schock hatte längere Einwirkung von Blaulicht (8 Std.) einen schwachen Schutzeffekt.

6. Die Fraktionierung des Gesamtphosphates ließ keine spezifische Beeinträchtigung eines Phosphatstoffwechselweges erkennen.

7. Es wurde eine Methode erarbeitet, den ATP- und ADP-Gehalt direkt aus einer dünnen Algensuspension (Zellzahl 3 x 10^6 / ml) im Abstand weniger Sekunden zu bestimmen. Der Hitzeschock (5' 45° C D) senkt längerfristig den ATP-Gehalt der Zellen, bedingt aber unmittelbar nach dem Schock ein Überschießen des ATP-Gehaltes, das auf eine kurzfristige Atmungssteigerung zurückgeführt werden konnte (Abb. 36, 37).

8. Die auch bei der Anzucht während der Übergänge Dunkel - Licht und Licht - Dunkel auftretenden Regulationsvorgänge im ATP- und ADP-Gehalt wurden durch den Hitzeschock nicht verändert. Bei "Licht aus" fiel der ATP-Gehalt augenblicklich stark ab, erreichte dann innerhalb von 30'' fast den Ausgangswert. Eine derart schnelle Regulation wurde bei Lichtbeginn nicht beobachtet.

9. Die physiologischen Veränderungen nach Hitzeschocks wurden in ihrem zeitlichen Auftreten und in ihrem Ausmaß verglichen; als am stärksten geschädigt erwiesen sich die Photosysteme (Abb. 27, 28), die in der gegen Hitze empfindlichsten Phase ein Aktivitätsmaximum besitzen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ANDERSAG, R. (1972): über die Verarbeitung von Glukose durch Chlorellakulturen im blauen und roten Spektralbereich. - Dissertation, Göttingen.

ARMSTRONG, J.McD. (1964): The molar extinktion coefficient of 2,6 DCPIP. - Biochim. Biophys. Acta 86, 194-205.

ASH, O. and W.S. ZAUGG (1961): Photoreduction of methylred and tetrazoliumblue by Spinach chloroplasts and chromatophores of Rhodospirillum rubrum. - Acta Chem. Scand. 15, 1629-1638.

BADOUR, S.A. (1961): Kennzeichnung von Mineralsalzmangelzuständen bei Grünalgen mit analytisch-chemischer Methodik. II. Phosphatfraktionen bei Kaliummangel im Vergleich mit Magnesium- und Manganmangel. - Flora 151, 99-119.

BÄCHI, B. and L. ETTLINGER (1973): Influence of glukose on adeninnucleotids level and energie charge in Acetobakter aceti. - Arch. Mikrobiol. 93, 155-164.

BECKER, E.W. and H. SCHMELLENKAMP (1972): Temperature dependent ^{14}C incorporation into Cyanidium caldarium. - In: Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research, ed. G. FORTI, M. AVRON, 2051-2058.

BEN ZIONI, A. and C. ITAI (1972): Short and long-term effekts of high temperatures on Tobacco leaves. I. Photosynthesis. - Physiol. Plant. 27, 216-219.

- a. - (1973): Short and long-term effekts of high temperatures on Tobacco leaves. III. Efflux and ^{32}P-incorporation into phospholipids. - Physiol. Plant. 28, 493-497.

BERZBORN, R.J. and N.J. BISHOP (1972): Isolierung und Charakterisierung von Chloroplastenfragmenten aus synchronen Scenedesmus-Kulturen. - Ber. Dt. Bot. Ges. 85, 415-424.

BLIGH, E.G. and W.J. DYER (1959): A rapid method of total lipid extraktion and purification. - Can. J. of Biochem. and Physiol. 37 (8).

BORNEFELD, T., J. DOMANSKI and W. SIMONIS (1972): Influence of light conditions, gassing and inhibitors on photophosphorylation and ATP-level in Anacystis nidulans. In: Proceedings of the IInd international congress on photosynthesis research, ed. G. FORTI et al., 1371-1378.

BROWN, J.S. (1969): Factors affecting absorption and fluorescence spektra of natural chlorophyll complexes. In: Carnegie Institution Year Book 67, 528-534.

CHENIAE, G.M. and J.F. MARTIN (1973): Absence of oxygen evolving capacity in dark grown Chlorella. The photoactivation of oxygen evolving centers. - Photochem. and Photobiol 17, 441-459.

COLE, H.A., J.W.T. WIMPENNY and D.E. HUGHES (1967): The ATP-pool in E. coli. I. Measurement of the pool using a modified luciferase assay. - Biochim. Biophys Acta 143, 445-453.

DÖHLER, G. (1972): Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Photosyntheseinduktion bei Chlorella vulgaris mit radioaktivem CO_2. - Planta 107, 33-42.

- (1973): Neue Ergebnisse über die Induktionseffekte der photosynthetischen CO_2-Aufnahme bei Anacystis und Chlorella. - Ber. dt. Bot. Ges. 86, 371-379.

DÖHRING, G. and H.T. WITT (1972): The photoacitve chlorophyll a_{II} in photosynthesis. In: Proceedings of the IInd international congress on photosynthesis research, ed. G. FORTI et al.

ELROY, Mc and H. SELINGER (1966): Firefly Bioluminescence. In: Bioluminescence in Progress, Princeton, Ed. F.H. JOHNSON and Y. HANEDA, 427-458.

EVENSON, R. and G. PRESCOTT (1971): Disruption of DNA synthesis in Euplotes by heat shock. - CABS 39677.

FORDE, B. and M. BALLATINE (1970): The effekt of light intensity and temperature on plant growth and chloroplast ultrastructure in Soybean. - Am. J. Bot. 57, 1150-1158.

FRENCH, C.S. (1954): A curve analyzer and general purpose graphical computer. - Riv. Scient. Instr. 25, 765-775.

- (1957): Derivative spectrophotometrie. - Proc. Instr. Soc. Am. 8, 83-94.

- (1970): The forms of chlorophyll a in fractions of chloroplasts from different sources. - Carnegie Institution Year Book 68, 578-587.

- (1971a): The distribution and action in photosynthesis of several forms of chlorophyll. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2893-2897.

- , J.S. BROWN and M.C. LAWRENCE (1971b): The forms of chlorophyll in chloroplast fraction of various algae. - Carnegie Institution Year Book 70, 487-495.

GIESE, A. and C.S. FRENCH (1955): The analysis of overlapping spectral absorption bands by derivative spectrophotometrie. - Appl. Spectroscopy 9, 78-89.

GIMMLER, H.,(1973): Correlations between photophosphorylation and light induced conformational changes of chloroplasts in whole cells of the halophilic green alga Duniella parva. - Z. für Pflanzenphysiol. 68, 289-307.

- , W. URBACH, W.D. JESCHKE und W. SIMONIS (1968): Die unterschiedliche Wirkung von Disalicyldenpropandiamin auf die cyklische und nichtcyklische Photophosphorylierung in vivo sowie auf die ^{14}C-Markierung einzelner Photosyntheseprodukte. - Z. für Pflanzenphysiol. 58, 353-364.

- , S. NEIMANIS, I. EILMANN und W. URBACH (1971): Photopnosphorylation and photosynthetic $^{14}CO_2$ fixation in vivo. II. Comparison of cyclic and non-cyclic photophosphorylation with photosynthetic $^{14}CO_2$ fixation during the synchronous life cycle of Ankistrodesmus braunii. - Z. für Pflanzenphysiol. 64, 358-366.

GIRAU, C.V. (1972): Control of glycolysis by orthophosphate and ATP in soluble extrakts of germinating Pea seeds. - Planta 108, 29-38.

HALLIER, U.W. and R.B. PARK (1969): Photosynthetic light reaktions in chemically fixed Anacystis nidulans, Chlorella pyrenoidosa and Porphyridium cruentum.-Plant Physiol. 44, 535-539.

HARNISCHFEGER, G. (1970): Correlations between structure and function in isolated disintegrating chloroplasts. - Dissertation Florida State University.

HAVEMANN, J. and M. DONZE (1972): Electron donation to photosystem II. in: Proceedings of the IInd international congress on photosynthesis research, ed. G. FORTI et al., 81-91.

HEBER, U. (1973): Stoichiometry of reduction and phosphorylation during illumination of intact chloroplasts. - Biochim. and Biophys. Acta 305, 140-152.

HEISE, K.P. (1972): Die Freisetzung von Lipiden aus Thylakoiden isolierter Chloroplasten von Spinacea oleracea. - Diss. Göttingen.

HEW, C.S., G. KROTKOV and D.T. CANVIN (1969): Effects of temperatures on photosynthesis and CO_2-evolution in light and darkness by green leaves. - Plant Physiol. 44, 671-677.

HINKSON, J.W. and L.P. VERNON (1959): Comparison of three photochemical activities of chloroplasts. - Plant Physiol. 34, 268-272.

HOLMS, W.H., S.D. HAMILTON and A.G. ROBERTSON (1972): The rate of turnover of the ATP pool of E. coli growing aerobically in simple defined media. - Arch. Mikrobiol. 83, 95-101.

ITAI, C. and A. BEN ZIONI (1973): Short and longterm effects of high temperatures on Tobacco leaves. II. O_2-uptake and amylolytic activity. - Physiol. Plant. 28, 490-492.

JASTER, G. (1970): Veränderungen des Chlorophyllgehaltes synchronisierter Chlorella durch Hitzeschocks. - Unveröff. Staatsexamensarbeit Göttingen.

JUNGNICKEL, F. (1971): Zur Temperaturabhängigkeit der Phosphataufnahme und Atmung phosphatverarmter Hefezellen. - Biochem. und Physiol. d. Pflanzen 162, 301-309.

KATHOH, S. and A. SAN PIETRO (1967): Ascorbate supported NADP photoreduktion by heated Euglena chloroplasts. - Arch. Biochem. and Biophys. 122, 144-152.

KOK, B. and A. DATKO (1965): Reducing power generated in the second photoact of photosynthesis. - Plant Physiol. 40, 1171-1177.

KOLB, W., W. TANNER and O. KANDLER (1972): Cyclic phosphorylation and changes of inorganic phosphate in Chlorella. In: Proceedings of the IInd international congress on photosynthesis research, ed. G. FORTI et al.

KRAPF, G. (1971): ATP Bestimmungen bei Purpurbakterien mit Hilfe des Luziferin-Luziferase-Systems von Photinus pyralis. - Unveröff. Diplomarbeit Göttingen.

KRAUSE, G.H. (1971): Indirekter ATP-Transport zwischen Chloroplasten und Zytoplasma während der Photosynthese. - Z. f. Pflanzenphys. 65, 13-23.

KUHL, A. (1960): Die Biologie der kondensierten anorganischen Phosphate. - Ergeb. d. Biol. 23, 144-186.

- (1962): Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorganischer Phosphate in Chlorella. - Vortr. Gesamtgeb. Bot. N.F. 1, 157-166.

KYLIN, A. and J.E. TILLBERG (1967): Action sites of the inhibitor-ß complex from potato and of phloridzin in light induced energy transfer in Scenedesmus. - Z. f. Pflanzenphysiol. 57, 72-78.

- a. - (1967): The relation between total photophosphorylation, level of ATP and oxygen evolution in Scenedesmus as studied with DCMU and antimycin A. - Z. f. Pflanzenphysiol. 58, 165-174.

LEWENSTEIN, A. and K. SCHNEIDER (1972): The level of ATP in Chlorella. In: Proceedings of the IInd international congress on photosynthesis research, ed. G. FORTI et al., 1371-1378.

LORENZEN, H. (1957): Synchrone Zellteilungen von Chlorella bei verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln. - Flora 144, 473-496.

- (1959): Die photosynthetische O_2-Produktion von Chlorella bei kurzfristig intermittierender Belichtung. - Flora 147, 382-404.

- (1961): Das Verhalten synchroner Kulturen von Chlorella pyrenoidosa an der oberen Temperaturgrenze des Wachstums. - Vortr. Gesamtgeb. Bot. N.F. 1, 231-238.

- (1963): Temperatureinflüsse auf Chlorella pyrenoidosa unter besonderer Berücksichtigung der Zellentwicklung. - Flora 153, 554-592.

LUDLOW, C.J. and R.B. PARK (1969): Actionspektra for PS I and PS II in formaldehyde fixed algae. - Plant. Physiol. 44, 540-543.

LÜTTGE, U., E. BALL and K.v. WILLERT (1971): Gas exchange and ATP levels of green cells of leaves of higher plants as affected by FCCP and DCMU in invitro experiments. - Z. f. Pflanzenphysiol. 65, 326-335.

LYMAN, H. (1970): Light dependence of temperature induced bleaching in Euglena gracilis. - Ber. Biochem. und Biologie 321, 84-89.

MACHOLD, O., A. MEISTER und K. ADLER (1971): Spektroskopische Eigenschaften von elektrophoretisch getrennten Chlorophyll-Protein-Komplexen der Photosysteme I und II aus Vicia faba und Chlorella pyrenoidosa. - Photosynthetica 5(2), 160-165.

MEISTER, A. (1966): Zur Untersuchung der verschiedenen Formen von Chlorophyll in der lebenden Pflanze durch Derivativ-Spektrophotometrie. - Die Kulturpflanze, Bd. XIV, 235-255.

- u. T.G. MASLOVA (1969): Spektroskopische Untersuchungen der Formen von Chlorophyll im Blatt unter dem Einfluß einiger schädigender Faktoren. - Photosynthetica 1, Vol. 3, 63-68.

MC'KINEY, G. (1941): Absorption of light by chlorophyll solutions. - J. Biol. Chem. 140, 315-322.

MICHEL, J.M. and M.R. MICHEL-WOLWERTZ (1968): Fractionating of of the photosynthetic apparatus from broken spinach chloroplasts by sucrose density gradient centrifugation. - Carnegie Institution Year Book 67, 514-520.

- a. - (1969): Absorption spektra of fraktious obtained from Chlorella pyrenoidosa. - Carnegie Institution Year Book 67, 520-526.

MICHEL-WOLWERTZ, M.R. (1969): Effect of enzymatic digestion of chloroplast lamellae on chlorophyll absorption. - Carnegie Institution Year Book 67, 505-507.

MUKOHATA, Y. et al. (1973a): Biophysical studies on subcellular particles. VI. Photosynthetic activities in isolated Spinach chloroplasts after transient warming. - Plant and Cell Physiol. 14, 11-118.

- et al. (1973b): Biophysical studies on subcellular particles. VII. Combined effects of alkohol and heat on photosynthetic activities in isolated Spinach chloroplasts. - Plant and Cell Physiol. 14, 119-126.

NESBAKKEN, R. (1973): Aspects of free fatty acid metabolism during induced hypothemia. - Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 31, 72-82.

ONWUEME, J. and A. LAWANSON (1973): Effect of heat stress on subsequent chlorophyll accumulation in seedlings of Colocynthis citrullus. - Planta 110, 81-84.

PFISTERER, J. (1970): Untersuchungen über die Photophosphorylierung in isolierten Chromatophoren aus Rhodospirillum rubrum. - Diss. Göttingen.

PIRSON, A. und A. KUHL (1958): Über den Phosphathaushalt von Hydrodictyon I. - Arch. Mikrobiol. 30, 211-225.

- , H. LORENZEN und A. KÖPPER (1959): A sensitive stage in synchronized cultures of Chlorella. - Plant Physiol. 34, 353-355.

- und H.G. RUPPEL (1962): Über die Induktion einer Teilungshemmung in synchronen Kulturen von Chlorella. - Arch. Mikrobiol. 42, 299-309.

POSTIUS, S. (1972): Photochemische Aktivitäten isolierter Chloroplasten aus verdunkelten Pflanzen von Spinacea oleracea. - Diss. Göttingen.

RAMIREZ, J. and L. SMITH (1968): Synthesis of ATP in intact cells of Rhodospirillum rubrum and Rhodopseudomonas spheroides on oxygenation or illumination. - Biochim. and Biophys. Acta 153, 466-475.

ROE, J.H. (1955): The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. - J. biol. Chem. 212, 335-343.

RUPPEL, H.G. (1962): Untersuchungen über die Zusammensetzung von Chlorella bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel. - Flora 152, 113-138.

SCHOR, S., P. SIEKEVITZ and G. PALADE (1970): Cyclic changes in thylakoid membranes of synchronized Chlamydomonas reinhardii. - Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 174-180.

SENGER, H. (1965): Die teilungsinduzierende Wirkung des Lichtes in mixotrophen Synchronkulturen von Chlorella. - Arch. Mikrobiol. 51, 307-322.

- (1970): Quantenausbeute und unterschiedliches Verhalten der beiden Photosysteme des Photosyntheseapparates während des Entwicklungsablaufes von Scenedesmus obliquus in Synchronkulturen. - Planta 92, 327-346.

- and N.J. BISHOP (1969): Changes in the photosynthetic apparatus during the synchronous life cycle of Scenedesmus obliquus. - Progress in Photosynthesis Research Vol I, 425-434.

- a. - (1972): Changes in fluorescence and absorbance during synchronous growth of Scenedesmus. In: Proceedings of the IInd International congress on photosynthesis, ed. G. FORTI et al., 677-687.

SHIBATA, K. (1959): Spektrophotometry of translucent biological materials. Opalglass transmission method. In: D. GLICK (ed.): Methods in biochemical analysis. Interscience Publishers N.Y., 77-109.

SIMONIS, W. und W. URBACH (1973): Photophosphorylation in vivo. In: Ann. Rev. of Plant Physiol. 24, 89-114.

SOROKIN, C. (1957): Changes in photosynthetic activity in the course of cell development in Chlorella. - Physiol. Plant Vol. 10, 659-666.

STEUP, M. (1972): Über die Beziehungen zwischen Kohlenhydrat-, Protein- und Phosphatstoffwechsel bei Chlamydomonas reinhardii Dangeard im blauen und roten Spektralbereich. - Diss. Göttingen.

- (1974): in Vorbereitung

STREHLER, B.L. (1970): Adenosin 5'-triphosphat und Cratinphosphat. In: BERGMEYER: Methoden der enzymatischen Analyse, 2036-2050.

- and R. TROTTER (1972): Determination of ATP and relatid compounds by firefly luminescence and other methods. In: Methods of biochemical analysis. Ed. D. GLICK. Interscience Publishers Bd. I, 341-356.

STUART, T.S. (1971): Hydrogen produktion by photosystem I of Scenedesmus: Effect of heat and salicyldoxime on electron transport and photophosphorylation. - Planta 96, 81-92.

- and H. GAFFRON (1972): The mechanism of hydrogen photoproduction by several algae. II. The contribution of PS II. - Planta 106, 101-112.

SYKES, J. and J.A. GIBBON (1967): ATP-produktion in the light and the dark by vesikle preparations isolated from Chlorobium thiosulphatophilum L 660. - Biochim. and Biophys. Acta 143, 173-186.

TISCHNER, R. and H. LORENZEN (1974): Effect of high growth temperatures on cell compounds and enzymes in synchronized Chlorella. - New Botanist 1.

TURKHIN, J. (1970): Effect of temperature on growth of Chlorella in an intensive culture. - Ber. Biochem. and Biology 318, 334-341.

URBACH, W. and W. KAISER (1972): Changes of ATP.levels in green algae and intact chloroplasts by different photosynthetic reaktions. In: Proceedings of the IInd international congress on photosynthesis research, ed. G. FORTI et al.

VERNON, L.P. (1961): Photoreduction of methylred an tetrazoliumblue by ascorbate, catalysis by chlorophyll and porphyrins in aquous media. - Acta Chem. Scand. 15, 1639-1650.

- and M.O. HOBBES (1957): Reduction of low-potential compounds by illuminated leaf homogenate and chloroplasts. - J. Biol. Chem. Vol. 72, No 1, 25-36.

- , E.R. SHAW and D. LIMBACH (1966): Comparison of red. 2,6-DPIP and Tetramethyl-p-Phenylenediamine as donors for methylred photoreduktion by Spinach chloroplasts and chlorophyll a, plastocyanin requirement. In: Current in Photosynthesis, ed. J.B. THOMAS and J.C. GOEDHEER, 121-128.

WEIGL, J. (1963): Die Bedeutung der energiereichen Phosphate bei der Ionenaufnahme durch Wurzeln. - Planta 60, 307-321.

WERTHMÜLLER, K. (1972): Photosynthetisches Verhalten von Synchronkulturen beim Übergang von Autotrophie zur Mixotrophie. - Ber. dt. Bot. Ges. 85, 435-442.

- and H. SENGER (1972): Changes in the photosynthetic apparatus during ageing of algal cultures. In: Proceedings of the IInd international congress on photosynthesis research, ed. G. FORTI, 2641-2657.

WILCEK, I. (1971): Die Wirkungen des blauen und roten Lichtes auf die Diatomee Cyklothella cryptica. - Diss. Göttingen.

WIESSNER, W. and C.S. FRENCH (1970): The forms of native chlorophyll in Chlamydobotris stellata and their changes during adaptation from photoheterotrophic to autotropnic growth. - Planta 94, 78-90.

- , -, J.S. BROWN and M.C. LAWRENCE (1971): Four common forms of chlorophyll a. - Carnegie Institution Year Book 69, 662-670.

Herrn Prof. Dr. H. Lorenzen danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für sein stetes Interesse an dem Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. Heise und Herrn Dr. Harnischfeger danke ich für praktische Hilfen, Herrn Dr. Steup für gute Zusammenarbeit.

Besonders danke ich all denen, die durch Diskussionen und Bereitstellung von Material die Weiterführung dieser Arbeit erleichtert haben.

Vom März 1972 an wurde diese Arbeit durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz unterstützt.

Lebenslauf

Rudolf Ehrenfried Tischner, geboren am 17. Juli 1944 in Saalfeld/Saale, Thüringen, als Sohn des Heinrich Tischner und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Illig. Seit dem 17.7.71 verheiratet mit Renate Tischner, geb. Suchfort.

1950 - 1955	Grundschule in Göttingen
1955 - 1964	Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen
1964 - 1966	Wehrdienst in der Bundeswehr
19.4.1966	Beginn des Studiums an der Universität Göttingen
14.6.1971	1. Staatsexamen in den Fächern Biologie, Chemie und Pädagogik
September 1971	Beginn mit der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. H. Lorenzen am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen.

Meine akademischen Lehrer in den Hauptfächern waren die Herren Professoren:

Amelunxen, Ax, Birukow, Brockmann, Ellenberg, Glemser, Heberer, Jacobi, Lorenzen, Pirson, Rensing, Schlegel, Schlote, Trebst und Wießner.